

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANE LOPES DA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS MIOSINAS DE CLASSES I E XIII DE
Trypanosoma cruzi

CURITIBA

2011

JULIANE LOPES DA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS MIOSINAS DE CLASSES I E XIII DE
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2011

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

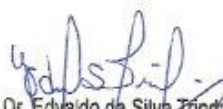
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Juliane Lopes da Rocha** no dia 25 de maio de 2011, no Instituto Carlos Chagas (ICC) defendeu sua Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "**Caracterização funcional das miosinas de classe I e XIII de *Trypanosoma cruzi***", com a banca examinadora constituída, pelos Prof. Drs. Walderson Duarte da Rocha (UFPR), Célia Regina Cavichiolo Franco (UFPR), e Daniela Parada Pavoni (ICC, orientadora e Presidente da Banca Examinadora), e tendo sido Aprovada.

A solicitação de emissão do Diploma de Mestre em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Esta Declaração tem validade por 60(sessenta) dias, a partir da data da mesma.

Curitiba, 25 de maio de 2011.


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

Frank A. Clark

Dedico este trabalho a todos os que me apoiaram,
incentivaram e acreditaram que eu seria capaz, em
especial a meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha orientadora Dani, por estes mais de quatro anos de convivência, desde que cheguei ao laboratório fazendo estágio probatório, iniciação científica e finalmente o mestrado. Agradeço pela confiança de ter me dado a responsabilidade de entrar neste projeto e por acreditar que eu seria capaz, mesmo quando eu ainda tinha minhas dúvidas. Agradeço por toda a dedicação, apoio, paciência, cobranças, críticas e até mesmo pelas broncas, pois sem isso eu não teria crescido, amadurecido e me tornado quem sou. Enfim, obrigada por TUDO.

Em segundo, um super obrigado à Cheysa, parceira de projeto que se tornou grande amiga! Foram dois anos trabalhando juntas, mas também dois anos de apoio, risadas, choros, alegrias, tristezas, desabafos e todos os tipos de emoção que passamos juntas, às vezes de satisfação por ver um resultado bacana, muitas vezes de decepção por ver um resultado ruim. Obrigada por fazer parte desta etapa da minha vida.

Agradeço a todos do laboratório. Às meninas Ana, Andreia, Cami, Carlinha, Fer, Flávia e Tahi, por diversos tipos de ajuda e contribuições em vários momentos do mestrado, mas principalmente, pela amizade e apoio emocional; à Paola pelas contribuições com ensaios de imunoprecipitação e proteômica; à Rita por diversos tipos de ajuda, principalmente com a manipulação de *T. cruzi*; ao Michel pelo auxílio com os vetores de *T. cruzi* e *T. brucei* e também pelo auxílio com a manipulação dos parasitas; aos demais meninos Eduardo, Felipe e Henrique, pelas diversas contribuições que auxiliaram a realização deste trabalho; ao Fernando pelo auxílio com a manipulação de camundongos; aos pesquisadores Christian, Fabrício e Stênio, por estarem sempre dispostos a ajudar a responder as diversas dúvidas que surgiram durante o mestrado; ao pessoal do preparo de materiais Nilson, Silvio, Tânia e Vanessa, pelo trabalho sempre eficiente no preparo de placas de culturas, soluções e outros materiais, contribuindo para que o trabalho pudesse ser realizado de uma forma muito mais rápida; e a todos do instituto, por todos os tipos de apoio e amizade.

Um agradecimento especial à minha família, ao meu pai, minha mãe, minha irmã, minha avó e minha tia, de quem muitas vezes me distanciei em virtude do mestrado, pois sempre chegava tarde em casa e em vários finais de semana e

feriados deixei de ficar com a família para fazer algum experimento no laboratório, ou mesmo em casa estava quase sempre na frente do computador ou de artigos para ler. Obrigada pelo amor incondicional, por sempre apoiar minhas decisões e torcer pelo meu sucesso, e pela preocupação para que tudo certo, afinal estão sempre me perguntando “e aí, já descobriu a função das miosinas?”.

Agradeço ao meu namorado Jeff por toda a dedicação e compreensão de namorar uma mestranda e entender minhas prioridades do momento, por me apoiar, incentivar e até mesmo aguentar minhas “crises nervosas” nos momentos que parecia que tudo estava dando errado.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, muitos dos quais acabei me distanciando neste período, mas que ainda me recebem de braços abertos. Principalmente à Mel, pela amizade, desabafos, companheirismo e por me entender e saber o que estou pensando e sentindo sem que eu precise falar alguma coisa.

Agradeço às minhas amigas de infância, Isa e Lali, pela eterna amizade que resiste ao tempo e à distância.

Agradeço ao programa de pós-graduação em biologia celular e molecular da Universidade Federal do Paraná e ao Instituto Carlos Chagas pela oportunidade de desenvolver este projeto de mestrado; aos revisores do projeto e dos relatórios parciais Andréa Ávila e Bruno Dallagiovanna, pelas correções e sugestões realizadas; aos membros da banca examinadora da defesa de mestrado Célia Regina Franco, Gisele Picchi e Wanderson da Rocha, por terem aceitado o convite de avaliar e contribuir com sugestões para aperfeiçoar esta dissertação; e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

O citoesqueleto dos organismos da família Trypanosomatidae é muito pouco estudado. Esta família inclui organismos que causam doenças em humanos, como doença de Chagas e doença do sono – *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, respectivamente – e leishmaniose – causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Microtúbulos são os principais filamentos dos tripanossomatídeos e ainda não foi detectada a presença dos filamentos de actina, embora já tenha sido mostrada a presença desta proteína por imunoenaios. Microtúbulos e filamentos de actina podem funcionar como trilhos para motores moleculares, responsáveis pelo transporte de carga. As miosinas são as proteínas motoras que se movem ao longo dos filamentos de actina e são classificadas de acordo com suas similaridades. Os tripanossomatídeos possuem a miosina de classe I, presente em quase todos os organismos eucarióticos, e uma miosina exclusiva da família, a de classe XIII. A presença desta miosina de tripanossomatídeos é bastante intrigante, principalmente porque pouco se sabe sobre o citoesqueleto de actina destes organismos. Este trabalho visa à caracterização funcional das duas miosinas de *T. cruzi* comuns aos tripanossomatídeos – myo1 e myo13 – e tem como propostas: verificação da expressão destas proteínas pelo parasita, localização celular e identificação de complexos proteicos ligados às miosinas obtidos por imunoprecipitação, utilizando anticorpos produzidos em camundongos; localização através da expressão da miosina inteira e cauda fusionadas à GFP em *T. cruzi*; remoção ou inibição da atividade funcional da proteína através de nocaute e ensaio dominante-negativo. Anticorpos foram produzidos em camundongos inoculados com os fragmentos cabeça e cauda das miosinas expressas em *E. coli*. Os soros produzidos se mostraram específicos para proteínas de tamanho esperado, porém os produzidos contra myo1 reagiram também contra outras bandas. Estes resultados de ligação cruzada podem ser explicados devido à baixa expressão desta proteína pelo parasita, como mostrado em estudos de proteômica e transcriptômica. Resultados de imunofluorescência da myo1 mostraram uma concentração da proteína próxima ao cinetoplasto, podendo ser a bolsa flagelar. Esta localização é semelhante à myo1 de *T. brucei*, que está envolvida com a endocitose. A imunolocalização realizada com o soro contra a myo13 marcou uma região na base do flagelo, a mesma região da myo13 de *L. donovani*, que está envolvida na montagem do flagelo. A cauda da myo1-GFP se localizou na mesma região da imunofluorescência, compatível com a bolsa flagelar, indicado que a carga pode ser a responsável pela localização desta miosina. Experimentos estão em andamento para a identificação dos complexos proteicos nos quais as miosinas estão interagindo. A superexpressão da cauda para promoção de um fenótipo dominante negativo não teve efeito morfológico visível a microscópio óptico ou na taxa de replicação de epimastigotas. Estamos trabalhando para a geração de parasitas nocaute. Baseando-se nas localizações e nos trabalhos publicados com *T. brucei* e *L. donovani*, sugerimos que a myo1 esteja envolvida com endocitose e tráfego de vesículas, e que a myo13 esteja envolvida com a montagem do flagelo. Assim, com este trabalho, iniciamos a caracterização das miosinas de *T. cruzi*, o que pode contribuir para um maior conhecimento do processo de transporte intracelular destes parasitas.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos. Miosinas. Citoesqueleto.

ABSTRACT

Cytoskeleton of Trypanosomatidae family organisms is very poorly studied. This family includes some organisms that cause human diseases, like Chagas disease and sleeping sickness – *Trypanosoma cruzi* and *T.brucei* respectively – and leishmaniasis – caused by different species from *Leishmania* genus. Microtubules are the main filament of trypanosomatids and it had not been detected yet the presence of actin filaments, although the presence of this protein has already been shown by immunoassays. Microtubules and actin filaments may function as track for molecular motors, responsible for the cargo transport. Myosins are motor proteins that move along actin filaments and are classified according to their similarities. Trypanosomatids possess class I myosin, present in almost all eukaryotic organisms, and a myosin exclusive of this family, class XIII. The presence of this myosin in trypanosomatids is really intriguing, mainly because little is known about actin cytoskeleton of these organisms. This work aims the functional characterization of the two myosins of *T.cruzi* common to trypanosomatids – myo1 and myo13 – and has as purposes: to verify these proteins expression by the parasite, to identify cellular localization and proteins that interact with myosins obtained by immunoprecipitation, using antibodies produced in mice; to localize whole and tail myosin fused to GFP in *T.cruzi*; to remove or inhibit the functional activity of the protein through knock out and dominant-negative assays. Antibodies were produced in mice inoculated with head and tail fragments of myosins expressed in *E.coli*. Sera produced were specific to proteins with the expected size, although sera produced against myo1 bound to other bands too. This cross-reaction may be explained due the poor expression of this protein by the parasite, as showed in proteomic and transcriptomic studies. Immunofluorescence results of myo1 showed a concentration of this protein near to the kinetoplast, maybe in the flagellar pocket. This localization is similar to *T.brucei* myo1, which is involved in endocytosis. Immunolocalization made with serum against myo13 marked the proximal region of flagellum, the same localization of *L.donovani* myo13, which is involved at the flagellum assembly. Myo1-GFP tail localized at the same region of the immunofluorescence, consistent with the flagellar pocket, indicating that cargo may be responsible for the localization of this protein. Experiments are being made to identify protein complexes where myosins can be interacting. Tail superexpression to promote a dominant-negative phenotype did not have morphologic effects visible in optic microscope or at the epimastigotes cellular division. We are working to generate knock out parasites. Based in their localizations and in *T.brucei* and *L.donovani* published works, we suggest that myo1 is involved with endocytosis and vesicle traffic, and that myo13 is involved with flagellum assembly. So, with this work we initiated *T.cruzi* myosins characterization, which may contribute to a better knowledge of the intracellular transport process of these parasites.

Key words: Trypanosomatids. Myosins. Cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i>	23
FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DAS ESTRUTURAS CELULARES DE <i>T. cruzi</i>	24
FIGURA 3 – SECÇÃO TRANSVERSAL DE UMA CÉLULA DE <i>T. brucei</i> PROCÍCLICA MOSTRANDO A REGIÃO FLAGELAR	28
FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DE ACTINA EM <i>T. cruzi</i>	29
FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO DE ACTINA EM FORMAS PROCÍCLICAS (a) E EM FORMAS SANGUÍNEAS (b) DE <i>T. brucei</i>	30
FIGURA 6 – COLOCALIZAÇÃO DE ACTINA COM LECTINA DE TOMATE EM FORMAS SANGUÍNEAS DE <i>T. brucei</i>	31
FIGURA 7 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE ACTINA MARCADA POR IMUNOCITOQUÍMICA EM PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i>	32
FIGURA 8 – ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS SEQUENCIAS DE 1984 DOMÍNIOS MOTORES DE MIOSINAS.....	35
FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO DA MIOSINA DE CLASSE I NAS FORMAS SANGUÍNEAS (A) E PROCÍCLICAS (B) DE <i>T. brucei</i>	37
FIGURA 10 – O EFEITO DO RNAi DA MYO1 NA MORFOLOGIA DE <i>T. brucei</i>	37
FIGURA 11 – LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DE ACTINA E MYO13 EM <i>L.</i> <i>donovani</i>	39
FIGURA 12 – ANÁLISE DO FORMATO CELULAR DE <i>L. donovani</i> COM A REMOÇÃO UM ALELO DA MYO13.....	39
FIGURA 13 – MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221	54
FIGURA 14 – ESQUEMA DA REACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO ENTRE O PRODUTO DE PCR E O VETOR DOADOR.....	54
FIGURA 15 – MAPA DO VETOR pDEST™17	55
FIGURA 16 – DESENHO ESQUEMÁTICO DOS VETORES DA PLATAFORMA pTcGW	56
FIGURA 17 – ESQUEMA DA REACÇÃO DE RECOMBINAÇÃO ENTRE O CLONE DE ENTRADA E O VETOR DE DESTINAÇÃO.....	57
FIGURA 18 - ESQUEMA DOS VETORES pNEO2 E pHIG2	74
FIGURA 19 – MAPA DO VETOR p2T7-177.....	75

FIGURA 20 – ESQUEMA DO VETOR p2T7-177 <i>lacZ</i>	75
FIGURA 21 – ESTRUTURA PRIMÁRIA DA MYO1 DE <i>T. cruzi</i> COM SEUS DOMÍNIOS RELEVANTES.....	78
FIGURA 22 – ESTRUTURA PRIMÁRIA DA MYO13 DE <i>T. cruzi</i> COM SEUS DOMÍNIOS RELEVANTES.....	79
FIGURA 23 – ALINHAMENTO DA MYO13 DE <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. vivax</i> e <i>L. major</i>	79
FIGURA 24 – ALINHAMENTO DA REGIÃO N-TERMINAL DA MYO1 DE <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>T. vivax</i> , <i>L. major</i> , <i>H. sapiens</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>C. elegans</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>A. thaliana</i>	80
FIGURA 25 – ALINHAMENTO DA REGIÃO DA CABEÇA DE TODAS AS MIOSINAS DE <i>T. cruzi</i>	82
QUADRO 1 – RELAÇÃO DE SEMELHANÇA ENTRE TODAS AS MIOSINAS DE <i>T. cruzi</i>	83
FIGURA 26 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR DAS CDS E FRAGMENTOS DAS MIOSINAS	84
FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA BACTERIANO DOS CLONES OBTIDOS POR <i>TOOTH PICK</i>	85
FIGURA 28 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS pDONR TM 221	85
FIGURA 29 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PCR DOS PLASMÍDEOS pDONR TM 221	86
FIGURA 30 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA BACTERIANO DOS CLONES OBTIDOS POR <i>TOOTH PICK</i>	87
FIGURA 31 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS (A) E PCR DOS PLASMÍDEOS (B).....	87
FIGURA 32 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS pTcGFPN, pTcPTP e pTcMYCN	88
FIGURA 33 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DE MIOSINAS.....	89
FIGURA 34 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO DO FRAGMENTO MYO1 CABEÇA.....	90
FIGURA 35 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO1 CABEÇA	90

FIGURA 36 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PURIFICAÇÃO POR ELETROELUIÇÃO	91
FIGURA 37 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO1 CAUDA	92
FIGURA 38 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PURIFICAÇÃO POR ELETROELUIÇÃO	92
FIGURA 39 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CABEÇA	93
FIGURA 40 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CABEÇA	94
FIGURA 41 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CABEÇA	94
FIGURA 42 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CAUDA	96
FIGURA 43 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PURIFICAÇÃO POR GEL PREPARATIVO.....	96
FIGURA 44 – RESULTADO DO TESTE PRÉ-IMUNE DE NOVE CAMUNDONGOS	97
FIGURA 45 – RESULTADO DO <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO1 APÓS A QUARTA INOCULAÇÃO.....	98
FIGURA 46 – RESULTADO DO <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO1 CABEÇA.....	99
FIGURA 47 – RESULTADO DO <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO13 APÓS A QUARTA INOCULAÇÃO.....	100
FIGURA 48 – RESULTADO DO <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO13.....	101
FIGURA 49 – RESULTADO DO <i>WESTERN BLOT</i> COMPETITIVO UTILIZANDO O SORO DOS CAMUNDONGOS APÓS A SEXTA INOCULAÇÃO CONTRA O EXTRATO PROTEICO DE <i>T. cruzi</i>	101
FIGURA 50 – RESULTADO DO <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO O SORO PURIFICADO DO CAMUNDONGO 1 h II CONTRA O EXTRATO PROTEICO DE <i>T. cruzi</i>	102

FIGURA 51– RESULTADO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PARASITAS NAS FORMAS EPIMASTIGOTAS UTILIZANDO OS SOROS CONTRA A MYO1	103
FIGURA 52 – RESULTADO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PARASITAS NAS FORMAS EPIMASTIGOTAS UTILIZANDO O SOROS CONTRA A MYO13	104
FIGURA 53 – RESULTADO DO <i>WESTERN BLOT</i> UTILIZANDO ANTISSOROS ESPECÍFICOS E ANTICORPOS ANTI-GFP.....	105
FIGURA 54 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DO GENE DA MYO1 INTEIRA.....	106
FIGURA 55 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DA CAUDA DA MYO1.....	107
FIGURA 56 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DO GENE DA MYO13 INTEIRA.....	107
FIGURA 57 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DA CAUDA DA MYO13.....	108
FIGURA 58 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcMYCN CONTENDO O INSERTO DO GENE DA MYO1 INTEIRA...	109
FIGURA 59 – RESULTADOS DE <i>WESTERN BLOT</i> DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE O ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO	110
FIGURA 60 – RESULTADOS DE <i>WESTERN BLOT</i> CONTRA EXTRATO PROTEICO DE <i>T. cruzi</i> OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS.....	111
FIGURA 61 – RESULTADOS DE <i>WESTERN BLOT</i> COM EXTRATOS DE PARASITAS TRANSFECTANTES E SELVAGEM UTILIZANDO ANTICORPO ANTI-GFP	112
FIGURA 62 – GEL DE POLIACRILAMIDA DA IMUNOPRECIPITAÇÃO COM O VETOR pTcPTP	113
FIGURA 63 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMPLIFICAÇÕES DAS REGIÕES INTERGÊNICAS E DOS CASSETES CONTENDO OS GENES PARA RESISTÊNCIA À NEOMICINA E À HIGROMICINA.....	114
FIGURA 64 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR DE FUSÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DO GENE MYO1 COM O CASSETE CONTENDO O GENE PARA RESISTÊNCIA A NEOMICINA.....	115
FIGURA 65 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR DA PCR DE FUSÃO	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO DOS GENES SELECIONADOS.....	49
TABELA 2 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA CLONAR AS CDS COMPLETAS E OS FRAGMENTOS “CABEÇA” E “CAUDA” DE CADA GENE.....	50
TABELA 3 – SEQUENCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA CLONAR NO VETOR p2T7-177 PARA INDUÇÃO DE INTERFERÊNCIA DE RNA EM <i>T. brucei</i>	50
TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAR AS REGIÕES QUE SERÃO UTILIZADAS PARA REALIZAR O NOCAUTE GÊNICO.....	51
TABELA 5 – IDENTIDADE E SIMILARIDADE DAS MIOSINAS DE CLASSE I E XIII DE <i>T. cruzi</i> COM AS MIOSINAS DE MESMA CLASSE DE OUTROS ORGANISMOS	81
TABELA 6 – TAMANHOS DAS REGIÕES INTERGÊNICAS E DOS CASSETES APÓS A FUSÃO COM OS CASSETES DE RESISTÊNCIA À NEOMICINA E À HIGROMICINA EM PARES DE BASES.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

AP – *Alcaline phosphatase* (Fosfatase alcalina)

ATP – Adenosina trifosfato

BCIP – *5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate p-Toluidine Salt*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta para Pesquisa Básica de Alinhamento Local)

BSA – *Bovine Serum Albumine* (Albumina Bovina Sérica)

CDS – *Protein Coding Sequence* (Sequência Codificadora de Proteína)

DAPI – *4'6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*

Dm – *Didelphis marsupialis*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos

DNase – Desoxirribonuclease

EDTA – Ácido etileno-diamino-tetracético

G418 – Antibiótico aminoglicosídeo relacionado à gentamicina

GFP – *Green Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente Verde)

HEPES – Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IPTG – *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

kDa – Quilo Dalton

kDNA – DNA do cinetoplasto

LB – Luria-Bertani

LIT – *Liver Infusion Tryptose* (Infusão de Fígado e Tryptose)

mRNA – RNA mensageiro

NBT – *Nitro-Blue Tetrazolium Chloride*

NP-40 – Nonidet P-40

pb – Pares de bases de nucleotídeos

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PTP – Proteína C, TEV, Proteína A

PFAM – *Protein Families* (Famílias de Proteínas)

PMSF – Fluoreto de fenil metil sulfonil

RNA – Ácido Ribonucleico

RNase – Ribonuclease

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TAU – *Triatomine Artificial Urine* (Urina artificial de Triatomíneo)

TAU3AAG – Urina artificial de Triatomíneo suplementado com os aminoácidos prolina, glutamato sódico e aspartato sódico e glicose

TBE – Tampão tris-borato-EDTA

TE – Tampão Tris-EDTA

TH1 – domínio de homologia 1

TRIS – Tris-hidroximetil aminometano

Tween 20 – Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana

UBA – *Ubiquitin Associated Domains* (Domínio Associado a Ubiquitina)

UTR – *Untranslated Region* (Região não traduzida)

T.A. – Tampão de Amostra para proteínas

TAP – *Tandem Affinity Purification* (Purificação por Afinidade em Tandem)

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> E OUTROS TRIPANOSSOMATÍDEOS	19
1.1.1 Doença de Chagas	20
1.1.2 Aspectos celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
1.2 CITOESQUELETO	26
1.2.1 Citoesqueleto de tripansomatídeos	27
1.2.2 Miosinas	33
1.3 JUSTIFICATIVA	40
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES	42
3.2 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES	44
3.3 MEIOS DE CULTURA	45
3.4 ORGANISMOS UTILIZADOS	46
3.5 CULTURAS DE PARASITAS	46
3.5.1 Culturas de <i>T. cruzi</i>	46
3.5.2 Culturas de <i>T. brucei</i>	47
3.5.3 Obtenção do extrato proteico dos parasitas	47
3.5.3.1 Extrato total para eletroforese	47
3.5.3.2 Extratos nativo e desnaturado para imunoprecipitação	48
3.5.4 Extração de DNA dos parasitas	48
3.6 SELEÇÃO DOS GENES	49
3.7 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES	49
3.8 AMPLIFICAÇÃO A PARTIR DE REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE	51
3.9 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	52
3.10 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR POR PEG	53
3.11 CLONAGEM NA PLATAFORMA GATEWAY® (INVITROGEN)	53
3.11.1 Geração de clones de entrada para a plataforma Gateway®	53

3.11.2 Geração de clones de expressão usando a reação de recombinação LR	55
3.12 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES.....	57
3.12.1 Preparação de bactérias cálcio-competentes.....	57
3.12.2 Transformação por choque térmico.....	58
3.13 SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS POR <i>TOOTH PICK</i>	59
3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	59
3.15 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS.....	61
3.15.1 Coloração com azul de coomassie.....	61
3.15.2 Coloração com nitrato de prata	62
3.15.3 Transferência para membrana de nitrocelulose e realização de <i>western blot</i>	62
3.16 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	63
3.17 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS EM CAMUNDONGOS	64
3.17.1 Avaliação dos anticorpos presentes no soro pré-imune	64
3.17.2 Inoculações das proteínas purificadas em camundongos	65
3.17.3 Verificação da produção de anticorpos contra a proteína recombinante e contra o extrato proteico de <i>T. cruzi</i>	65
3.17.4 Ensaio de <i>western blot</i> competitivo	66
3.17.5 Purificação dos anticorpos	66
3.18 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	67
3.19 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO	68
3.20 GERAÇÃO DE <i>T. cruzi</i> MUTANTES EXPRESSANDO MIOSINAS FUSIONADAS ÀS ETIQUETAS DE GFP, MYC E PTP	69
3.20.1 Preparo de lâminas contendo parasitas expressando miosinas fusionadas à etiqueta de GFP	70
3.20.2 Imunofluorescência de parasitas transfectados com o vetor pTcMYCN	71
3.20.3 Imunoprecipitação de parasitas transfectados com o vetor pTcPTP.....	71
3.20.3.1 Precipitação proteica com acetato de amônio.....	72
3.21 NOCAUTE GÊNICO EM <i>T. cruzi</i>	73
3.22 INTERFERÊNCIA POR RNAi EM <i>T. brucei</i>	74
4 RESULTADOS	77
4.1 SELEÇÃO E ANÁLISE DOS GENES.....	77
4.2 CLONAGEM DOS GENES E FRAGMENTOS EM VETORES DA PLATAFORMA GATEWAY®.....	83
4.2.1 Recombinação dos fragmentos em vetores para expressão heteróloga da	

proteína em <i>E. coli</i>	86
4.2.2 Recombinação das CDSs inteiras e caudas em vetores para expressão da proteína em <i>T. cruzi</i> fusionada a etiquetas.....	87
4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. coli</i>	88
4.3.1 Myo1 cabeça (79,2 kDa)	90
4.3.2 Myo1 cauda (53,6 kDa)	91
4.3.3 Myo13 cabeça (90 kDa)	92
4.3.4 Myo13 cauda (33,1 kDa)	95
4.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CAMUNDONGOS	96
4.4.1 Avaliação dos anticorpos presentes no soro pré-imune dos camundongos e inoculação da proteína recombinante	96
4.4.2.1 Myo1 (132,6 kDa)	97
4.4.2.2 Myo13 (120,5 kDa)	99
4.4.3 Realização de <i>western blot</i> utilizando competidor com o anticorpo primário e purificação dos anticorpos.....	100
4.5 IMUNOLOCALIZAÇÃO	102
4.6 PARASITAS TRANSFECTADOS COM VETORES DA PLATAFORMA pTcGW	105
4.6.1 Vetor pTcGFPN	105
4.6.2 Vetor pTcMYC	108
4.7 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO	109
4.8 NOCAUTE GÊNICO.....	112
4.9 INTERFERÊNCIA POR RNA EM <i>T. brucei</i>	116
5 DISCUSSÃO	117
6 CONCLUSÕES	125
7 PERSPECTIVAS.....	126
REFERÊNCIAS.....	127
ANEXO	133

1 INTRODUÇÃO

O grupo dos tripanossomatídeos possui organismos de grande importância médica pelo fato de serem causadores de diversas doenças, dentre eles *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e espécies de *Leishmania*, que causam a doença de Chagas, a doença do sono e as leishmanioses, respectivamente. São protozoários que divergiram muito cedo na escala evolutiva e, por isso, possuem diversas características diferentes das observadas em eucariotos superiores. Dentre estas características, está a organização da estrutura celular, assim como do citoesqueleto. O citoesqueleto é formado por filamentos de actina, de tubulina e de filamentos intermediários, e possui funções vitais em todas as células, sendo responsável, dentre outras, pela manutenção da forma da célula, proteção mecânica, movimento e locomoção, além de servir de trilho para o movimento que ocorre intracelularmente. Este movimento é devido à presença de proteínas motoras, que realizam o transporte de vesículas, proteínas e outras moléculas, ao longo dos filamentos. Uma família de proteínas motoras existentes é a família das miosinas, que interage diretamente com os filamentos de actina. Até o momento, sabe-se muito pouco sobre a estrutura do citoesqueleto em tripanossomatídeos, e menos ainda sobre o transporte intracelular. Assim, o presente trabalho visa aumentar a compreensão sobre o citoesqueleto e, especificamente, sobre as miosinas de *T. cruzi*.

1.1 *Trypanosoma cruzi* E OUTROS TRIPANOSSOMATÍDEOS

A família Trypanosomatidae, na qual se integra o *T. cruzi*, pertence à ordem Kinetoplastida (Euglenozoa, Kinetoplastea) (CAVALIER-SMITH, 2010), a qual abrange protozoários flagelados que possuem uma única mitocôndria que se estende através de todo o corpo celular e, em certa porção da mitocôndria, localizada próxima do corpo basal, há um complexo arranjo de fibrilas de DNA na matrix mitocondrial que forma uma estrutura chamada de cinetoplasto, também denominado de kDNA (SHAPIRO e ENGLUND, 1995; DE SOUZA, 2002; TELLERIA

et al., 2006). Os organismos membros da família Trypanosomatidae formam um grupo de protozoários distinguidos por terem apenas um único flagelo, e todos os membros são exclusivamente parasitas, encontrados primariamente em insetos (PODLIPAEV, 2001). Um pequeno grupo tem ciclos de vida envolvendo um segundo hospedeiro, que pode ser um vertebrado ou uma planta. Nestes, estão incluídas diversas espécies que causam doenças em humanos (SIMPSON *et al.*, 2006).

O gênero *Trypanosoma* constitui um dos mais importantes da família Trypanosomatidae, pois inclui o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, e duas subespécies do *Trypanosoma brucei* que ocasionam doenças em humanos, como *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*, ambos agentes da doença do sono, além do *T. b. brucei*, causador da enfermidade conhecida como nagana, em animais (HIDE, 1999).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há uma estimativa de 10 milhões de pessoas infectadas com *T. cruzi*, principalmente na América Latina. Mais de 25 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção e estima-se que em 2008 houve mais de 10.000 mortes em decorrência da doença. (<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/>, junho de 2010).

1.1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas foi descrita por Carlos Chagas, em 1909, que reportou não apenas seus elementos clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos, como, também, seu agente etiológico – um protozoário flagelado (originalmente, *Schizotrypanum cruzi*; hoje, *Trypanosoma cruzi*) –, algumas espécies vetoras transmissoras do parasita – insetos da Ordem Hemiptera – e alguns reservatórios silvestres (CHAGAS, 1909).

Após a infecção, há um período de incubação que depende da forma de transmissão do *T. cruzi* – aproximadamente uma semana se a transmissão for vetorial e de 20 dias a 3 meses se a transmissão for transfusional. A doença de Chagas compreende, basicamente, duas fases: a fase aguda e a fase crônica. As características de cada fase, assim como a evolução para a cura ou óbito, dependem de diversos fatores ligados ao *T. cruzi* – como cepa, virulência e tamanho

do inóculo –, ao homem – idade, sexo e provavelmente raça – e ao ambiente (revisto por CANÇADO, 2000).

A fase aguda da doença é usualmente silenciosa. Quando aparente – principalmente em crianças de baixa idade – os sintomas podem ser febre, dor de cabeça, edema, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningoencefalite e cardiopatia aguda. O conjunto e a intensidade dos sintomas são bastante variáveis de caso a caso. Esta fase dura aproximadamente de quatro a doze semanas e é caracterizada por elevada parasitemia (revisto por DIAS, 2000).

A fase crônica se inicia com diminuição da parasitemia e dos níveis de imunoglobulinas do tipo IgM e aumento das do tipo IgG. A evolução desta fase pode durar toda a vida do paciente. Esta fase pode ser representada por diversas formas clínicas: a indeterminada, caracterizada por ausência de sintomatologia, a cardíaca e a digestiva. A mortalidade da doença de Chagas está associada às formas cardíaca e digestiva, que constituem evoluções da forma indeterminada em 2 a 5% dos casos. A primeira se caracteriza por uma cardiopatia crônica, cujo aspecto mais importante é a fibrose (ANDRADE *et al.*, 1978). A forma digestiva caracteriza-se por esofagopatia e colopatia (revisto por DIAS, 2000).

Há três maneiras principais de transmissão da doença de Chagas: a vetorial, a transfusional e a congênita. A transmissão por via oral é responsável por um número significativo dos casos agudos da doença na Amazônia Brasileira (COURA *et al.*, 2002; BENCHIMOL-BARBOSA, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2009). Alimentos contendo ou o inseto-vetor ou suas fezes seriam a fonte de infecção. De menor impacto, há a contaminação através de transplantes de órgão e acidentes de laboratório (revisto por SCHMUÑIS, 2000).

A via vetorial de transmissão da doença é a responsável pela grande maioria dos casos registrados. Ela consiste na transmissão do *T. cruzi* através do inseto-vetor hematófago. Há várias espécies que naturalmente albergam o parasita, todas da ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Os triatomíneos são conhecidos como “barbeiros”, entre outros nomes vulgares. Os gêneros de maior importância epidemiológica são *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Acredita-se que os vetores, predominantemente silváticos, passaram a ter uma distribuição que se sobrepõe com a da espécie humana em decorrência de modificações realizadas pelo próprio homem no meio ambiente (SHERLOCK, 2000; GARCIA e AZAMBUJA, 2000).

O ciclo silvestre caracteriza-se pela circulação do parasita entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados em um ambiente silvático. Neste ciclo encontram-se mamíferos de pequeno porte, como marsupiais, desdentados, roedores, quirópteros, carnívoros e lagomorfos. Esta relação, estabelecida há milhares de anos no Continente Americano, atingiu um equilíbrio tal de forma que não se observa dano nem para o parasita e nem para nenhum dos hospedeiros que o albergam. O segundo ciclo – o doméstico – caracteriza-se pela introdução do *T. cruzi* em ambientes em urbanização, mas aos quais os vetores ainda têm importante acesso. Profundas alterações do meio ambiente, realizadas pelo homem, modificaram a distribuição de vetores e reservatórios silvestres, inserindo as populações humanas no ciclo de *T. cruzi*. Sendo assim, o homem passa a ser o mais recente reservatório mamífero e, como consequência desta nova relação, tanto o parasita quanto o homem travam uma batalha para a sobrevivência, que macroscopicamente e antropocentricamente, revela-se como a doença de Chagas (revisto por DIAS, 2000).

Durante o ciclo de vida do *T. cruzi* (FIGURA 1), que compreende dois tipos de hospedeiros (um vertebrado – mamífero e um invertebrado – inseto), o parasita mostra várias formas evolutivas que podem ser facilmente identificadas por microscopia óptica: tripomastigota, amastigota e epimastigota. No hospedeiro vertebrado, o ciclo se inicia quando tripomastigotas metacíclicos – presentes nas excretas do vetor – infectam células da pele ou mucosas do mamífero. Os parasitas podem atingir a corrente sanguínea e infectar outros tipos celulares. Após algumas horas no interior do vacúolo parasitóforo, os tripomastigotas metacíclicos escapam para o citoplasma onde se diferenciam em amastigotas, formas que se replicam no interior da célula. Após intensa divisão binária, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneos que rompem as células hospedeiras com o movimento intenso dos flagelos. Uma vez na corrente sanguínea os tripomastigotas podem infectar outras células ou serem ingeridos pelo inseto. No tubo digestivo do inseto, os tripomastigotas se instalam e evoluem para a forma replicativa epimastigota que, após repetidas divisões por fissão binária, migram para a porção posterior do intestino e transformam-se em tripomastigotas metacíclicos, finalizando o ciclo (revisto por BRENER, 1973, TYLER e ENGMAN, 2001).

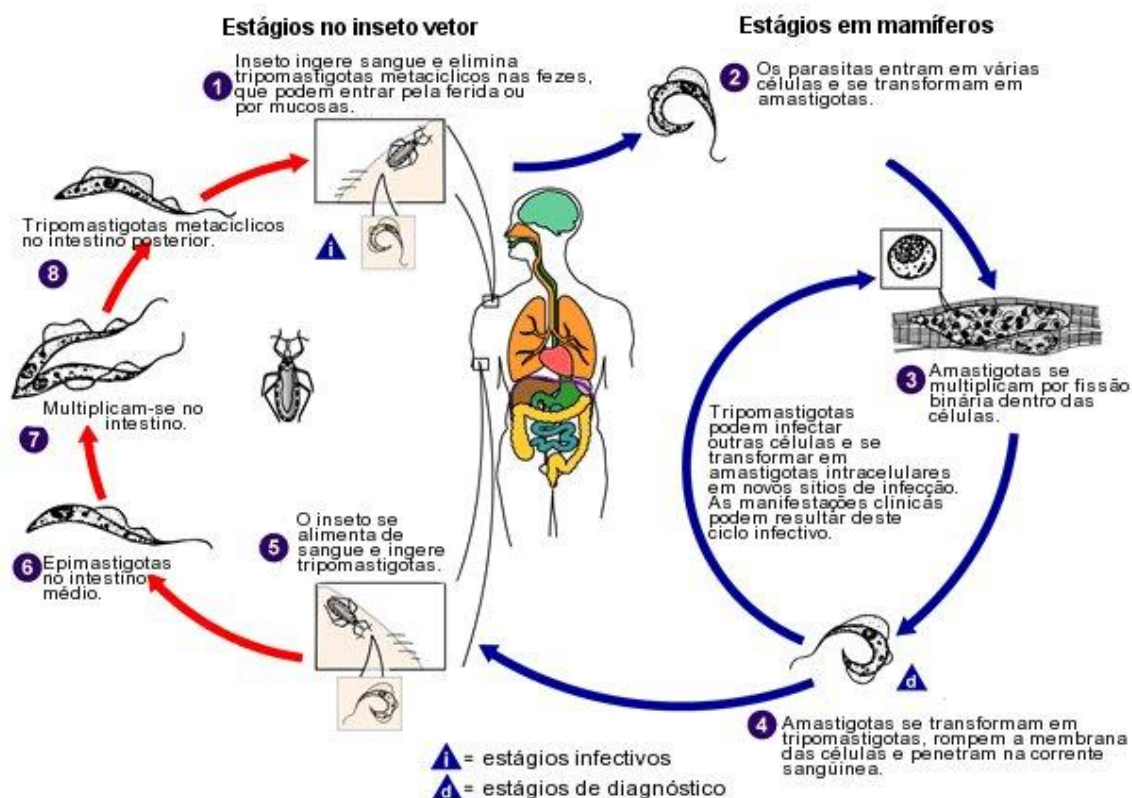


FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*

MODIFICADO DE: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>

NOTA: Aqui, o hospedeiro vertebrado está representado por um humano, mas o ciclo do *T. cruzi* pode ocorrer em diferentes mamíferos.

1.1.2 Aspectos celulares de *Trypanosoma cruzi*

A superfície celular dos tripanossomatídeos é composta basicamente por dois componentes: a membrana plasmática e uma camada formada por microtúbulos subpeliculares. Esta associação, em tripanossomatídeos, é tão forte que estes dois componentes se mantêm associados mesmo depois da lise do protozoário (revisto por DE SOUZA, 2002).

Todos os membros da família Trypanosomatidae têm um flagelo que emerge de uma invaginação chamada de bolsa flagelar. A proporção do comprimento total do flagelo para aquele dentro da região da bolsa flagelar varia de acordo com o estágio de desenvolvimento. Em *T. cruzi*, o comprimento do flagelo varia desde 1 µm na forma amastigota até aproximadamente 20 µm na forma epimastigota. O flagelo geralmente está unido ao corpo celular. Esta união pode ocorrer em apenas uma

determinada região, quando o flagelo emerge da porção central, ou ser extensa em estágio de desenvolvimento no qual o flagelo emerge lateralmente. Quando o movimento flagelar acontece, a onda propaga através do flagelo e, quando atinge a região onde está ligado ao corpo do parasita, induz a um aparente movimento do corpo, dando uma impressão visual de uma membrana ondulante (revisto por DE SOUZA, 2002).

A região de onde emerge o flagelo – bolsa flagelar – é formada por uma invaginação da membrana plasmática que estabelece uma continuidade direta com a membrana do flagelo. Devido ao fato que o revestimento das membranas do corpo celular e do flagelo estabelecem um contato uma com a outra no ponto de emergência do flagelo, a bolsa pode ser considerada como um compartimento extracelular especial de certa forma isolado do meio extracelular. Essa é uma região especializada da superfície dos tripanossomatídeos, pois é a única região que não apresenta a camada de microtúbulos subpeliculares, e o revestimento da membrana da bolsa flagelar difere tanto do revestimento da membrana do corpo celular como da membrana do flagelo em termos de distribuição de partículas intramembranasas e localização de proteínas. Há, ainda, evidências morfológicas e citoquímicas mostrando que a bolsa flagelar é o local onde ocorrem intensas atividades endocítica e exocítica (FIGURA 2, revisto por DE SOUZA, 2002).

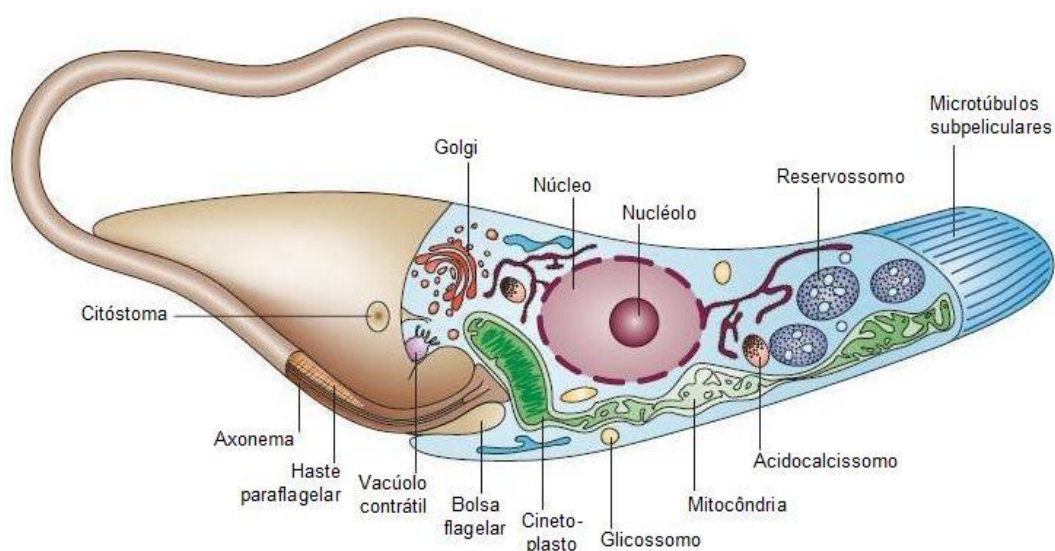


FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DAS ESTRUTURAS CELULARES DE *T. cruzi*
MODIFICADO DE: DO CAMPO *et al.* (2005)

Os estágios epimastigota e amastigota dos membros do subgênero *Schyzotrypanum* do gênero *Trypanosoma* (como *T. cruzi*, *T. vespertilionis* e *T.*

dionisii) possuem uma estrutura altamente especializada conhecida como complexo citóstoma-citofaringe, que aparece como uma estrutura afunilada formada devido a uma profunda invaginação da membrana plasmática que deve atingir a região nuclear. Os microtúbulos subpeliculares seguem a invaginação na membrana plasmática. Tem sido mostrado que quando epimastigotas são incubados com macromoléculas como transferrina e LDL ligadas a ouro, elas inicialmente se ligam à região do citóstoma e são então internalizadas via vesículas endocíticas que são formadas na base da citofaringe (revisto por DE SOUZA, 2002).

Enquanto o retículo endoplasmático pode estar distribuído por toda a célula, as cisternas do complexo de Golgi estão na porção anterior do corpo celular, próximo ao cinetoplasto e à bolsa flagelar (revisto por DE SOUZA, 2002).

O protozoário *T. cruzi*, assim como todos os organismos da ordem Kinetoplastida, possui uma única mitocôndria que se estende por todo o corpo celular. Em uma porção da mitocôndria, localizada próximo ao corpo basal, há um complexo arranjo de fibrilas do DNA na matriz mitocondrial que forma a estrutura conhecida como cinetoplasto (revisto por SIMPSON¹, 1972, citado por DE SOUZA, 2002). O DNA do cinetoplasto corresponde de 20 a 25% do DNA total do epimastigota de *T. cruzi* e é formado por uma rede de 20 a 30 mil moléculas de minicírculos além de 50 moléculas de maxicírculos. Os maxicírculos têm um tamanho comparável àquele encontrado no DNA mitocondrial de outras células eucarióticas e contêm os genes para os rRNA mitocondriais e proteínas envolvidas no caminho da fosforilação oxidativa (SIMPSON *et al.*, 1987). Os minicírculos estão envolvidos no processo de edição do mRNA transcrito pelos maxicírculos (STURM e SIMPSON, 1991). A divisão do cinetoplasto é co-ordenada com o processo de divisão celular. A divisão em *T. cruzi* começa com a replicação do corpo basal e do flagelo, seguida pela divisão do cinetoplasto (DE SOUZA e MEYER², 1974, citado por DE SOUZA, 2002).

O núcleo de *T. cruzi* possui forma variável, de acordo com o estágio celular. Em tripomastigotas, o núcleo é alongado e localizado na porção central da célula.

¹ SIMPSON, L. The kinetoplast of the hemoflagellates. **International Review of Cytology**, v. 32, p. 139-207, 1972

² DE SOUZA, W.; MEYER, H. On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. **Journal of Protozoology**, v. 21, n. 1, p. 48-52, 1974

Em epimastigotas e amastigotas, o núcleo é arredondado. Assim como nas demais células eucarióticas, o núcleo possui uma típica membrana nuclear com poros, e há uma continuidade entre a membrana nuclear externa e o retículo endoplasmático. Os cromossomos são difíceis de distinguir porque eles não se condensam em nenhum estágio do ciclo de vida. O nucléolo pode ser observado na região central do núcleo. Durante a divisão celular, o material genético se replica e o núcleo se divide por constrição na metade, sem que a membrana nuclear seja desfeita (revisto por DE SOUZA, 2002).

Os tripanossomatídeos possuem estruturas citoplasmáticas delimitadas por membranas e distribuídas randomicamente pelas células, os glicossomos. São organelas semelhantes aos peroxissomos, mas possuem enzimas glicolíticas envolvidas na conversão da glicose em 3-fosfoglicerato (revisto por DE SOUZA, 2002).

1.2 CITOESQUELETO

O citoplasma de células eucarióticas contém uma elaborada rede de proteínas filamentosas – o citoesqueleto – que compreende três polímeros distintos, mas integrados: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários. Como sugerido pelo próprio nome, o papel do citoesqueleto é, em parte, promover uma armação estrutural na célula, determinando o tamanho, forma e propriedades mecânicas da célula. No entanto, o citoesqueleto não é estático, mas altamente dinâmico; isto é ele pode ser rapidamente remodelado para encontrar novas necessidades celulares em resposta a programas homeostáticos intrínsecos assim como mudanças ambientais (KIM e COULOMBE, 2010).

Microfilamentos são os filamentos de menor espessura, aproximadamente 6 nm de diâmetro, e são formados pela polimerização de monômeros de actina, também chamada de actina globular (ou actina-G). Estes filamentos concentram-se próximos da membrana celular, sendo responsáveis pela resistência à tensão, manutenção da forma da célula, formação de protuberâncias citoplasmáticas e citocinese, além de compor os filamentos finos necessários para a contração muscular (ALBERTS *et al.*, 2004).

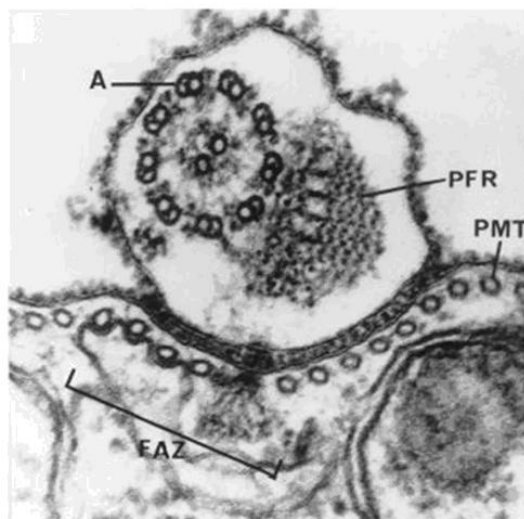
Microtúbulos são os filamentos mais espessos, com aproximadamente 25 nm de diâmetro, e são formados pela polimerização de dímeros de tubulina- α e β . São importantes para suporte estrutural, além de atuar em alguns processos celulares, como mitose, citocinese e transporte vesicular (ALBERTS *et al.*, 2004).

Os filamentos intermediários têm esse nome por terem uma espessura intermediária entre os microfilamentos e os microtúbulos, com aproximadamente 10 nm de diâmetro. São responsáveis por proporcionar estabilidade mecânica às células, constituídos de polipeptídeos fibrosos que resistem ao estiramento e desempenham um papel estrutural na célula, mantendo sua integridade. Existem filamentos intermediários de diferentes tipos, como queratina, desmina, vimentina e lamina (ALBERTS *et al.*, 2004).

1.2.1 Citoesqueleto de tripanossomatídeos

Estes organismos são caracterizados pela presença de um citoesqueleto muito particular responsável pela manutenção da forma e da modulação do formato celular entre os diferentes estágios do ciclo de vida. Como pode ser observado na figura 3, que exibe um corte transversal de uma célula de *T. brucei*, os componentes mais óbvios do citoesqueleto do gênero *Trypanosoma* são: córtex de microtúbulos subpeliculares, axonema, bastão paraflagelar e a zona de adesão do flagelo (KOHL e GULL, 1998).

Microtúbulos de 24 nm de diâmetro estão arranados helicoidalmente ao longo do longo eixo da célula em espaçamento regular (18-22 nm), formando o córtex subpelicular. Os microtúbulos individuais estão ligados a outros e à membrana plasmática por uma série de proteínas chamadas de proteínas associadas a microtúbulos (MAPs). O bastão paraflagelar (PFR) é uma estrutura reticulada que percorre ao lado do axonema – uma estrutura contrátil formada por nove pares de microtúbulos que formam um anel ao redor de um par de microtúbulos central, desde sua saída da bolsa flagelar até a ponta extrema do flagelo, sendo importante para a motilidade. A zona de adesão do flagelo é a região onde o flagelo está em contato com o corpo celular (KOHL e GULL, 1998).



A: Axonema
FAZ: Zona de adesão do flagelo
PFR: Bastão paraflagelar
PMT: Microtúbulos subpeliculares

FIGURA 3 – SECÇÃO TRANSVERSAL DE UMA CÉLULA DE *T. brucei* PROCÍLICA MOSTRANDO A REGIÃO FLAGELAR
MODIFICADO DE: KOHL E GULL (1998)

Antes mesmo de possuírem seus genomas sequenciados, o gene para actina já havia sido caracterizado em *T. brucei* (BEN AMAR *et al.*, 1988) e *L. major* (DE ARRUDA *et al.*, 1994), e dados de imunofluorescência usando antissoro criado contra actina de coelho confirmou a presença desta proteína no corpo celular de *T. brucei* (MORTARA, 1989) e *T. cruzi* (DE SOUZA *et al.*, 1983). No entanto, filamentos de actina ainda não foram visualizados por microscopia eletrônica (DE SOUZA, 2009), o que indica que a dinâmica de polimerização dos filamentos pode ser diferente da de eucariotos superiores. Cevallos e cols (2011) fizeram ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos policlonais contra actina de *T. cruzi* e observaram uma marcação por toda a célula epimastigota, com níveis de marcação aumentados próximo à região da bolsa flagelar e em fragmentos ao longo do flagelo. Estes fragmentos variam em número de célula para célula, mas estão normalmente presentes na parte final do flagelo. Em tripomastigotas, a marcação se mostrou fraca e uniformemente distribuída por toda a célula. Em amastigotas, a distribuição da actina é heterogênea, tendendo a se acumular na borda da célula (FIGURA 4). Em estudos anteriores, não foi observada associação da actina com os microtúbulos subpeliculares, com núcleo ou cinetoplasto (DE MELO *et al.*, 2008).

Foi mostrado que o tratamento com citocalasina B, um agente despolimerizador de actina, levou a alterações morfológicas em elementos do citoesqueleto associados com o complexo citóstoma-citofaringe de *T. cruzi*, dando

uma nova ênfase à importância que o citoesqueleto de actina deve ter para o funcionamento da célula (CORREA *et. al.*, 2008).

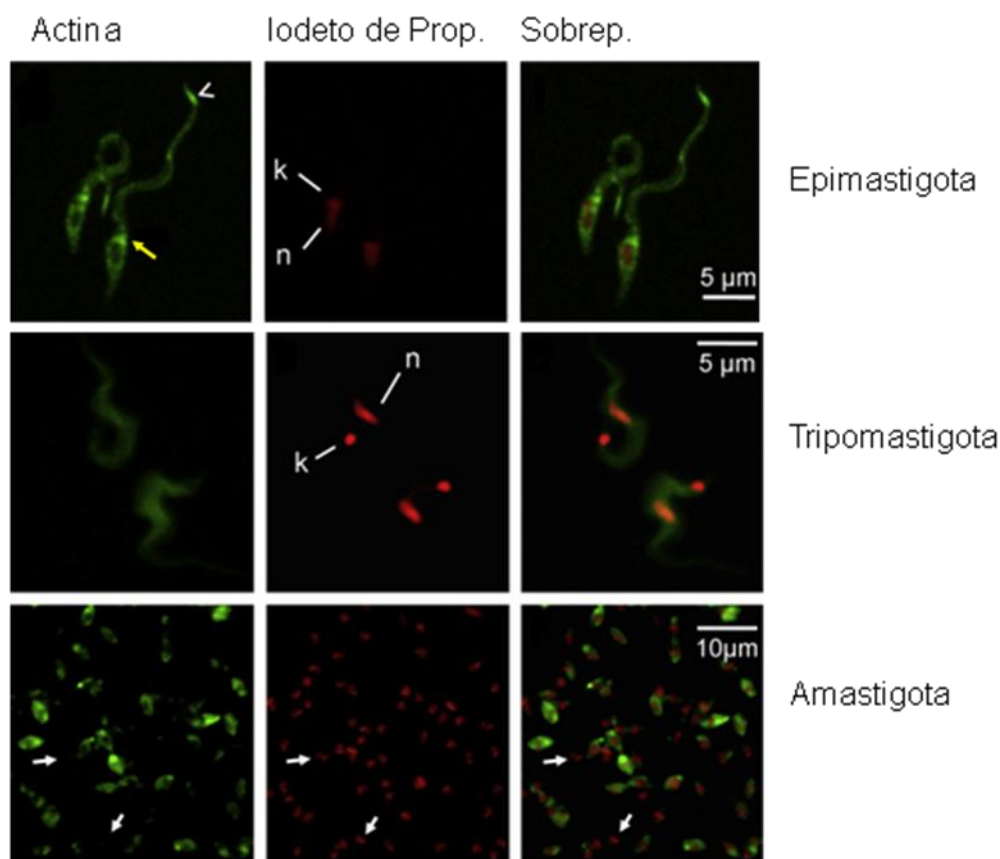


FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DE ACTINA EM *T. cruzi*
MODIFICADO DE: CEVALLOS *et al.* (2011)

NOTA: a seta aberta está indicando a concentração de actina em determinada porção do flagelo; a seta amarela está indicando a concentração de actina na região da base do flagelo; as setas brancas estão indicando parasitas não marcados pelo anticorpo anti-actina.

LEGENDA: Actina: imunofluorescência utilizando anticorpos anti-actina; Iodeto de Prop.: marcação com Iodeto de Propídio para visualização de ácidos nucleicos; Sobrep.: sobreposição Actina+Iodeto de Prop

Foram realizadas amplas buscas no genoma para a identificação de proteínas de ligação à actina de tripanossomatídeos que revelaram que, comparado com eucariotos superiores, os tripanossomatídeos exibem um grupo de proteínas, embora limitado, suficiente para teoricamente conduzir a montagem e desmontagem de filamentos de actina. Além disso, a existência em *T. cruzi* de duas sequências relacionadas com proteínas contendo o domínio ABD (TcCoronin e TcEB1), que em eucariotos superiores atuam como pontes moleculares entre microtúbulos e microfilamentos, sugerem que actina em *T. cruzi* pode existir na forma filamentosa (DE MELO *et al.*, 2008).

A localização de actina também foi visualizada por imunofluorescência em *T. brucei* utilizando anticorpos policlonais gerados a partir de um fragmento N-terminal da proteína actina do próprio parasita. Em formas procíclicas, a actina parece estar distribuída uniformemente por toda a célula. Em contraste, em formas sanguíneas, a actina está primariamente localizada na porção posterior da célula e a marcação está concentrada entre o núcleo e o cinetoplasto, como pode ser visto na figura 5 (GARCIA-SALCEDO *et al.*, 2004). Esta região da célula é o sítio de caminho endocítico altamente ativo em tripanossomas sanguíneos. A marcação com lectina de tomate – um marcador estável para o caminho endocítico em *T. brucei* – mostrou a colocalização com actina (FIGURA 6), indicando que esta proteína está distribuída através do caminho endocítico.

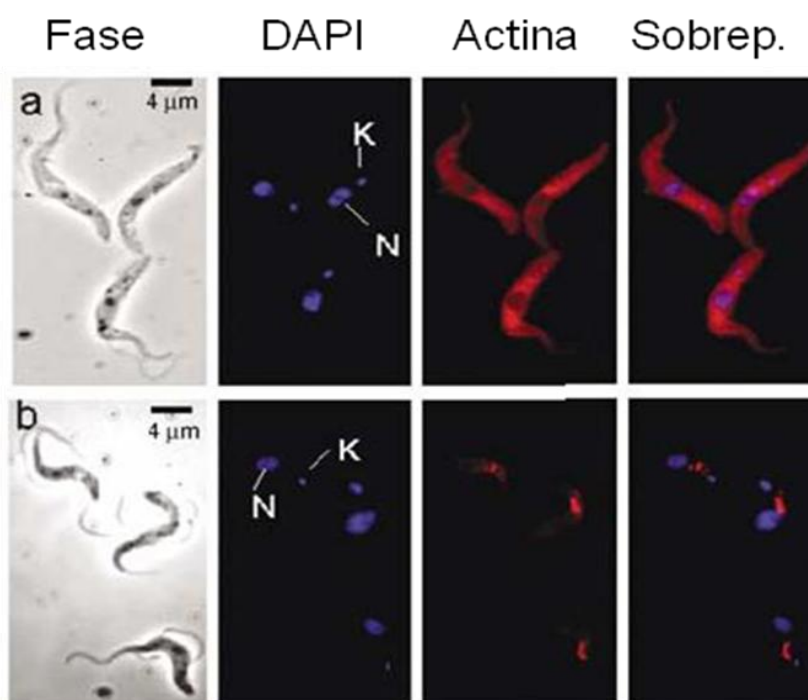


FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO DE ACTINA EM FORMAS PROCÍCLICAS (a) E EM FORMAS SANGUÍNEAS (b) DE *T. brucei*

MODIFICADO DE: GARCIA-SALCEDO *et al.* (2004)

LEGENDA: Fase: contraste de fase; DAPI: coloração por DAPI revelando o núcleo (N) e o cinetoplasto (K); Actina: imunofluorescência com anticorpos anti-actina; Sobrep.: sobreposição DAPI + Actina

Apesar de ser considerada uma proteína essencial, a repressão de mRNA de actina, através da interferência de RNA, em formas procíclicas de *T. brucei*, não produz efeitos óbvios no crescimento celular do parasita, que permanece crescendo e se dividindo em taxa normal. Em formas sanguíneas, no entanto, a repressão da expressão de actina por RNAi resulta na cessação de crescimento, perda da

atividade endocítica e terminação do tráfego vesicular da membrana da bolsa flagelar (GARCIA-SALCEDO, *et al.*, 2004). Estes resultados sugerem que os tripanossomas têm necessidades funcionais diferentes para actina durante as diferentes fases do ciclo de vida.

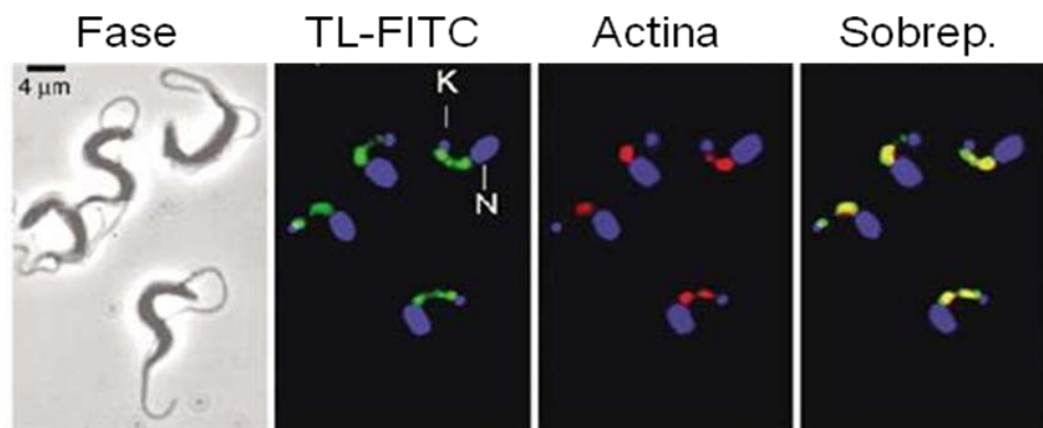


FIGURA 6 – COLOCALIZAÇÃO DE ACTINA COM LECTINA DE TOMATE EM FORMAS SANGUÍNEAS DE *T. brucei*

MODIFICADO DE: GARCIA-SALCEDO *et al.* (2004)

LEGENDA: Fase: contraste de fase; TL-FITC: lectina de tomate conjugado à FITC, mostrando o núcleo (N) e o cinetoplasto (K); Actina: imunofluorescência com anticorpos anti-actina; Sobrep.: sobreposição TL-FITC + Actina

Ao analisar o tráfego de secreção em *T. brucei* que sofreu a repressão de actina, não é notado diferenças em relação às culturas selvagens, o que mostra que actina é necessária apenas para o tráfego endocítico, e não interfere no tráfego secretor destes organismos (NOLAN e GARCIA-SALCEDO, 2007).

Em *Leishmania donovani*, foi mostrado que a proteína actina está presente no flagelo, bolsa flagelar, núcleo e cinetoplasto, além de nas membranas nuclear, vacuolar e na face citoplasmática da membrana plasmática, associada aos microtúbulos subpeliculares e à rede de kDNA (FIGURA 7, SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004). Enquanto que os oligômeros de actina são dissociados em monômeros pelo tratamento com latrunculina B ou citocalasinas, células de *Leishmania* não sofreram alterações quando submetidas ao tratamento com estes compostos (SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004). Para verificar se o nível reduzido da oligomerização de actina em *Leishmania* era devido à ausência de algumas proteínas que assistem/promovem a formação de filamentos de actina, Sahasrabuddhe e cols. (2004) expressaram a actina de *Leishmania* em células BHK 21 e então estimaram a quantidade de formas oligoméricas tanto de actina de BHK 21 como de actina de *Leishmania* nas células transfectadas. Os resultados

indicaram claramente que o nível de oligomerização da actina de *Leishmania* não aumentou, mesmo com a presença das proteínas que promovem a formação de filamentos de actina, indicando que as propriedades da actina de *Leishmania* diferem significativamente das actinas de levedura, de *Plasmodium* e humanas. Devido à presença de actina juntamente com o citoesqueleto cortical, Sahasrabuddhe e cols. (2004) especulam que a actina em *Leishmania* pode ter um papel na manutenção da forma celular pela assistência da rede de microtúbulos subpeliculares em sua associação com a membrana plasmática. Assim, a associação microtúbulos-actina talvez possa ser requerida para o transporte de vesículas e movimento de organelas (revisto por RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Também, a presença de actina na bolsa flagelar sugere um papel na endocitose (MORGAN *et al.*, 2002a; MORGAN *et al.*, 2002b).

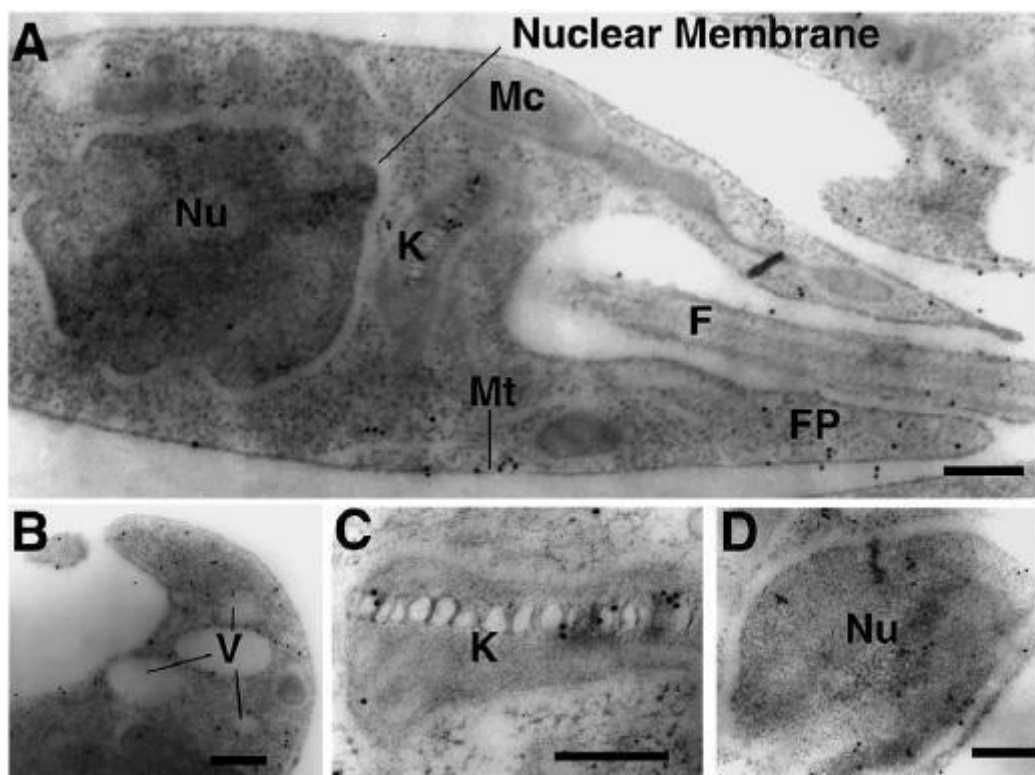


FIGURA 7 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE ACTINA MARCADA POR IMUNOCITOQUÍMICA EM PROMASTIGOTAS DE *Leishmania*

FONTE: SAHASRABUDDHE *et al.* (2004)

LEGENDA: **A:** Localização de actina aos redores dos microtúbulos subpeliculares (Mt), flagelo (F), bolsa flagelar (FP), cinetoplasto (K), núcleo (Nu), citoplasma e membrana nuclear; **B:** presença de actina nas membranas de vacúolos (V); **C:** associação com a rede do cinetoplasto; **D:** membrana nuclear

Estes escassos estudos mostram que os eventos que regulam o citoesqueleto de tripanossomatídeos e o papel que este exerce no transporte intracelular são ainda pouco entendidos, e há necessidade de maiores informações

a fim de aumentar a compreensão sobre o assunto. Assim, o estudo de proteínas associadas ao mecanismo de transporte que envolve os filamentos de actina, as miosinas, pode ser importante para ajudar a elucidar o papel deste tipo de transporte e, com isso, o papel dessas estruturas nestes organismos.

1.2.2 Miosinas

Miosinas são proteínas que pertencem a um grupo chamado de proteínas motoras que interagem com filamentos de actina e estão envolvidas com várias formas de movimentação celular como morfogênese celular, endocitose, citocinese, transdução de sinal e tráfego de organelas e partículas (MOOSEKER e CHENEY, 1995). Elas geralmente compreendem três regiões: uma “cabeça” conservada, na extremidade N-terminal, responsável pela ligação à actina, atividade ATPase e geração de movimento; um curto “pescoço” formado por uma simples alfa-hélice que pode possuir domínios IQ (isoleucina-glutamina) que interagem com cadeias leves de miosina (calmodulina) e pode atuar como uma alavanca; e uma cauda variável que geralmente se liga à carga e determina a especificidade funcional do motor. O movimento ocorre porque o sítio para ligação da actina e de ATP estão funcionalmente ligados: quando o ATP está presente, o motor tem baixa afinidade pelo filamento de actina e, por outro lado, esta afinidade aumenta se o sítio estiver vazio ou com ADP. Como a hidrólise de ATP gera ADP (e fosfato inorgânico), este ciclo catalítico também está ligado a um ciclo de ligação e desligamento dos filamentos de actina. A ligação a actina também é acompanhada por uma força gerada por mudança conformacional, referida como força de trabalho (HOWARD³, 2001, citado por MCCONNELL E TYSKA, 2010).

A primeira miosina descoberta foi a miosina responsável pela contração muscular, é historicamente a mais estudada e conhecida por miosina convencional ou miosina de classe II. Miosinas descobertas posteriormente que não estavam envolvidas com a contração muscular foram denominadas de não-convencionais.

³ HOWARD, J. Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton, **Sinauer Associates, Inc**, p. 384, 2001.

Costumava-se dizer que as miosinas não-convencionais eram responsáveis apenas pelo transporte de organelas e outras moléculas sobre o esqueleto de actina. No entanto, trabalhos recentes mostraram a relação de moléculas de miosinas com outras estruturas – microtúbulos e estruturas nucleares – sugerindo que novos estudos sejam realizados a fim de elucidar as diferentes funções exercidas por estas proteínas (WOOLNER e BEMENT, 2009), indicando a grande importância que estas proteínas exercem nas células.

Em 2007, Odrionitz e Kollmar construíram uma árvore filogenética baseada na análise de 2269 domínios motores de miosinas de 328 organismos (FIGURA 8) e propuseram um consenso de nomenclatura para as miosinas em 35 classes. A miosina de classe I possui a distribuição taxonômica mais ampla e sugere-se que seja a miosina mais ancestral. Apenas duas linhagens principais não contêm miosinas de classe I: Viridiplantae e Alveolata. A segunda classe de miosina que surgiu durante a evolução dos reinos Fungi e Metazoa foi a de classe V. Após a separação da classe das plantas, surgiu a miosina de classe II. As miosinas que não puderam ser agrupadas com alguma outra miosina, nem de outro organismo e nem do mesmo, foram chamadas de órfãs, sendo exclusivas deste.

Em 2005, com a finalização do projeto genoma de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* (EL SAYED *et al.*, 2005), foi verificado que estes organismos possuem o gene para a miosina classificada como de classe I além de outro gene para uma miosina que não possui relação com nenhuma outra miosina identificada em outro grupo que não os tripanossomatídeos. O projeto genoma de *L. infantum* e *L. braziliensis* (PEACOCK *et al.*, 2007) finalizado em 2007, mostrou que esses dois organismos também possuem genes para essas duas miosinas. *T. cruzi* possui ainda outros sete genes para miosinas sem relação com miosinas de nenhum outro organismo e nem relação entre si, sendo, portanto, chamadas de miosinas órfãs (localizadas na região mostrada pela seta azul na figura 8). De acordo com a classificação de Odrionitz e Kollmar (2007), a miosina presente apenas em tripanossomatídeos foi nomeada como miosina de classe XIII (destacado em vermelho na figura 8). Em 2005, Foth e cols. haviam proposto outra classificação para as miosinas e, neste trabalho, a miosina exclusiva de tripanossomatídeos recebeu a denominação de classe XXI, essa foi a identificação utilizada por outros pesquisadores que estudaram esta miosina em outros tripanossomatídeos, mas trata-se da mesma classe aqui chamada de XIII.

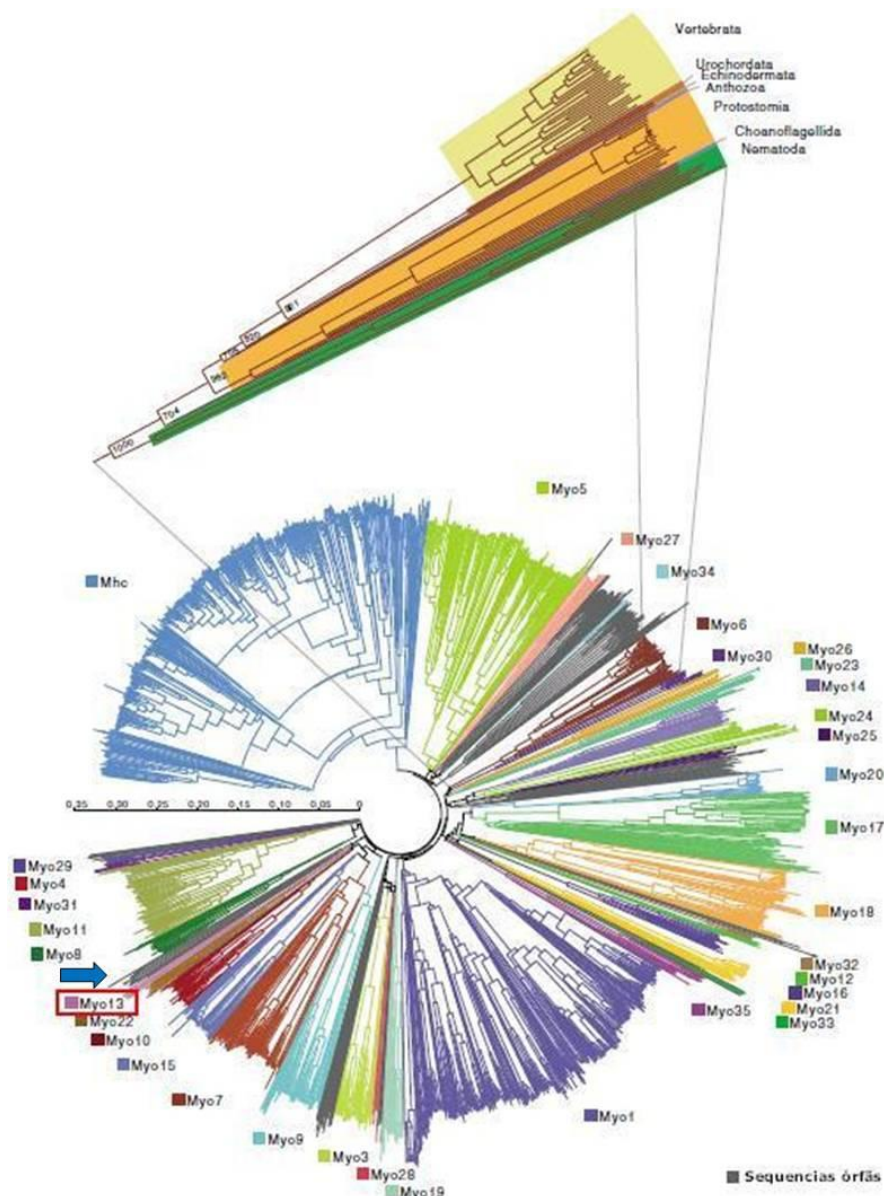


FIGURA 8 – ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DO ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS SEQUÊNCIAS DE 1984 DOMÍNIOS MOTORES DE MIOSINAS

FONTE: ODRONITZ E KOLLMAR (2007)

NOTA: em vermelho, está destacada a classe XIII de miosinas; a seta azul mostra a localização de seqüências órfãs.

As miosinas de classe I (myo1) possuem a habilidade de se ligarem simultaneamente a filamentos de actina e a membranas celulares. Devido à sua habilidade para gerar força mecânica e sua alta prevalência em vários tipos celulares, estas moléculas estão bem posicionadas para realizar várias funções biológicas importantes, como endocitose, exocitose, liberação de vesículas extracelulares e a regulação da tensão entre a membrana e o citoesqueleto (MCCONNELL E TYSKA, 2010). As interações com membrana são mediadas por um domínio de homologia 1 na região C terminal da cauda (TH1), um domínio

altamente básico que contém um motivo de homologia putativo a pleckstrina (PH) de ligação a lipídio, que se liga especificamente e com alta afinidade a fosfatidilinositol-bifosfato (MCCONNELL E TYSKA, 2010).

A *myo1* de *T. brucei* foi recentemente identificada e caracterizada como uma miosina de classe I não usual (SPITZNAGEL *et al.*, 2010). Primeiramente porque a cauda desta mioisina se inicia com um domínio WW associado com interações proteína-proteína, e geralmente não encontrado em miosinas de classe I. Segundo, apesar do domínio TH1 estar presente, os primeiros 18 resíduos parecem estar faltando, e o domínio é interrompido pela inserção de um domínio putativo de ligação a zinco FYVE, um domínio com o potencial para se ligar a proteínas de membrana via interação com fosfatidilinositol-3-fosfato (SPITZNAGEL *et al.* 2010).

Anticorpos anti-*myo1* de *T. brucei* mostraram um nível similar de expressão da proteína em ambas as formas do ciclo de vida, no entanto, ensaios de imunofluorescência mostraram que enquanto nas formas procíclicas a miosina era fraca e uniformemente distribuída por toda a célula, nas formas sanguíneas a miosina estava localizada como uma série de pontos discretos distribuídos exclusivamente entre o núcleo e o cinetoplasto (FIGURA 9, Spitznagel *et al.*, 2010). Este resultado é semelhante ao obtido para a imunofluorescência com anticorpos anti-actina de *T. brucei* (GARCIA-SALCEDO *et al.*, 2004).

Também foi realizada interferência por RNA para o gene da *myo1* em *T. brucei* e os resultados foram novamente semelhantes ao observado com a interferência por RNA para o gene da actina (SPITZNAGEL *et al.*, 2010). Na fase procíclica, apesar de ter uma diminuição de cerca de 90% da proteína, não foram observados efeitos no crescimento celular, na motilidade e na morfologia da célula. No entanto, nas formas sanguíneas a divisão celular cessou em pouco tempo após a indução do RNAi e a morte celular ocorreu de 2 a 3 dias após a indução. As células se tornaram progressivamente aumentadas e distorcidas na porção posterior (FIGURA 10). Este fenótipo morfológico (conhecido como *big eye* – grande olho, em inglês) é consistente com a diminuição da atividade endocítica, mas contínuo tráfego de membrana para a superfície, demonstrando que a miosina de classe I de *T. brucei* realiza uma importante função na atividade endocítica destes organismos (SPITZNAGEL *et al.*, 2010). Até o momento, esse é o único estudo da *myo1* de tripanossomatídeos.

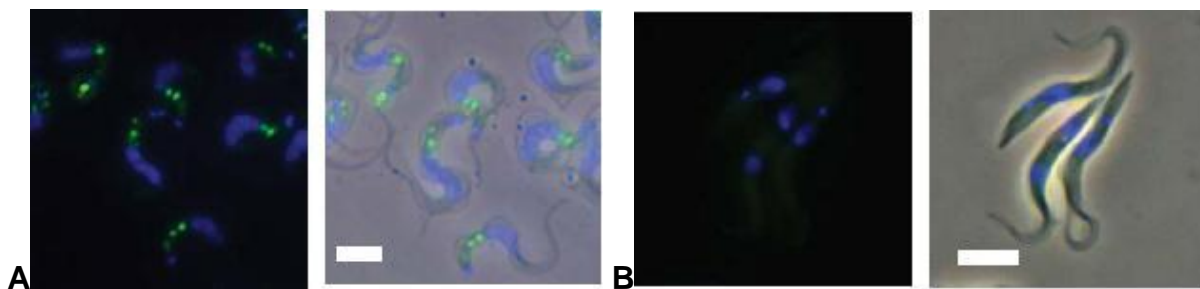


FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO DA MIOSINA DE CLASSE I NAS FORMAS SANGUÍNEAS (A) E PROCÍCLICAS (B) DE *T. brucei*
MODIFICADO DE: SPITZNAGEL *et al.* (2010)

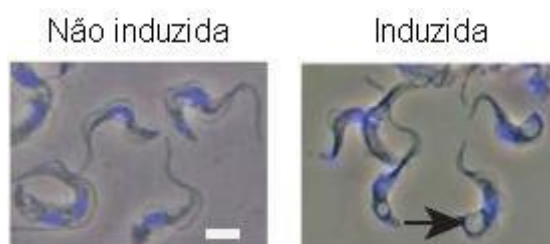


FIGURA 10 – O EFEITO DO RNAi DA MYO1 NA MORFOLOGIA DE *T. brucei*
MODIFICADO DE: SPITZNAGEL *et al.* (2010)

NOTA: Um grande vacúolo (seta) localizado entre cinetoplasto e núcleo (azul) é visível nas culturas induzidas.

As miosinas de classe XIII (*myo13*), exclusiva dos tripanossomatídeos, contêm domínios associados à ubiquitina (UBA) em sua extremidade C-terminal. Os domínios UBA geralmente estão presentes em proteínas envolvidas na via de degradação associadas ao proteassomo/ubiquitina, mas ainda não se sabe a sua função nestas miosinas. A *myo13* foi recentemente estudada por Katta e cols. (2009) em *Leishmania spp.* Imunofluorescência realizada com anticorpos produzidos contra a proteína recombinante mostrou que esta miosina se localiza na região da base do flagelo (FIGURA 11 A). Foram preparadas construções para expressão em *L. donovani* com a miosina inteira e domínio cabeça fusionadas à GFP na extremidade C-terminal e domínio cauda fusionada à GFP na extremidade N-terminal. Os resultados, mostrados na figura 11 B, mostraram que a localização da proteína permaneceu a mesma quando analisadas as células expressando a cauda fusionada à GFP, enquanto que a cabeça fusionada à GFP ficou dispersa por toda a célula. Estes resultados sugerem que a localização celular da *myo13* é dependente apenas do domínio da cauda.

Em 2010, Katta e cols. mostraram que a porção da miosina de *Leishmania* que interage com a actina é a cabeça, da mesma forma como ocorre nos demais eucariotos. Esta análise foi feita a partir de promastigotas de *Leishmania*

transfectados, expressando a etiqueta de GFP conjugada apenas à cabeça de miosina na extremidade C-terminal, conjugada apenas à cauda de miosina na extremidade N-terminal e também conjugada à miosina inteira na extremidade C-terminal. Estas células foram lisadas com Triton x-100 (1% v/v) e as frações solúveis em detergente foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpos anti-GFP. Foi detectada a presença de actina nos imunoprecipitados expressando tanto a miosina inteira como a cabeça de miosina, e não nos imunoprecipitados expressando a cauda de miosina. Estes resultados não apenas confirmaram a presença de complexos actina-myo13 em promastigota de *Leishmania* como também revelaram que o domínio cabeça da myo13 é responsável pelas interações com actina. Eles também removeram um alelo da myo13 por recombinação homóloga e viram que os mutantes heterozigotos eram menores, arredondados e com um flagelo de tamanho significativamente menor, incapaz de realizar a locomoção da célula (FIGURA 12). Nas células mutantes, foi ainda observada a ausência do bastão paraflagelar – presente nos flagelos dos tripanossomatídeos – e diminuição das taxas de endocitose e exocitose. Estes resultados mostraram a importância da myo13 na montagem do flagelo e no tráfego de vesículas de *Leishmania*. A myo13 não foi estudada em nenhum outro organismo até o momento.

Em *T. cruzi*, a presença da miosina de classe XIII, exclusiva de tripanossomatídeos, e a presença de outras sete miosinas exclusivas é bastante intrigante, principalmente pelo fato de que pouco se sabe sobre o citoesqueleto destes organismos. Nenhuma miosina foi estudada em *T. cruzi* ainda, e a localização determinada das miosinas em outros tripanossomatídeos deve ser investigada em *T. cruzi*, já que elas podem exercer um papel diferente. Primeiro porque *T. cruzi* tem estágios celulares diferentes de *T. brucei* e *Leishmania* – *T. cruzi* possui as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota, *T. brucei* possui as formas tripomastigota e epimastigota, e *Leishmania* possui as formas promastigota e amastigota. Segundo porque, como *T. cruzi* possui tantas outras miosinas, a myo1 e a myo13 podem ter adquirido um papel diferente do exercido em organismos com apenas estas duas miosinas. Assim, o objetivo de nosso trabalho foi estudar as miosinas para aprofundar os conhecimentos sobre estas moléculas.

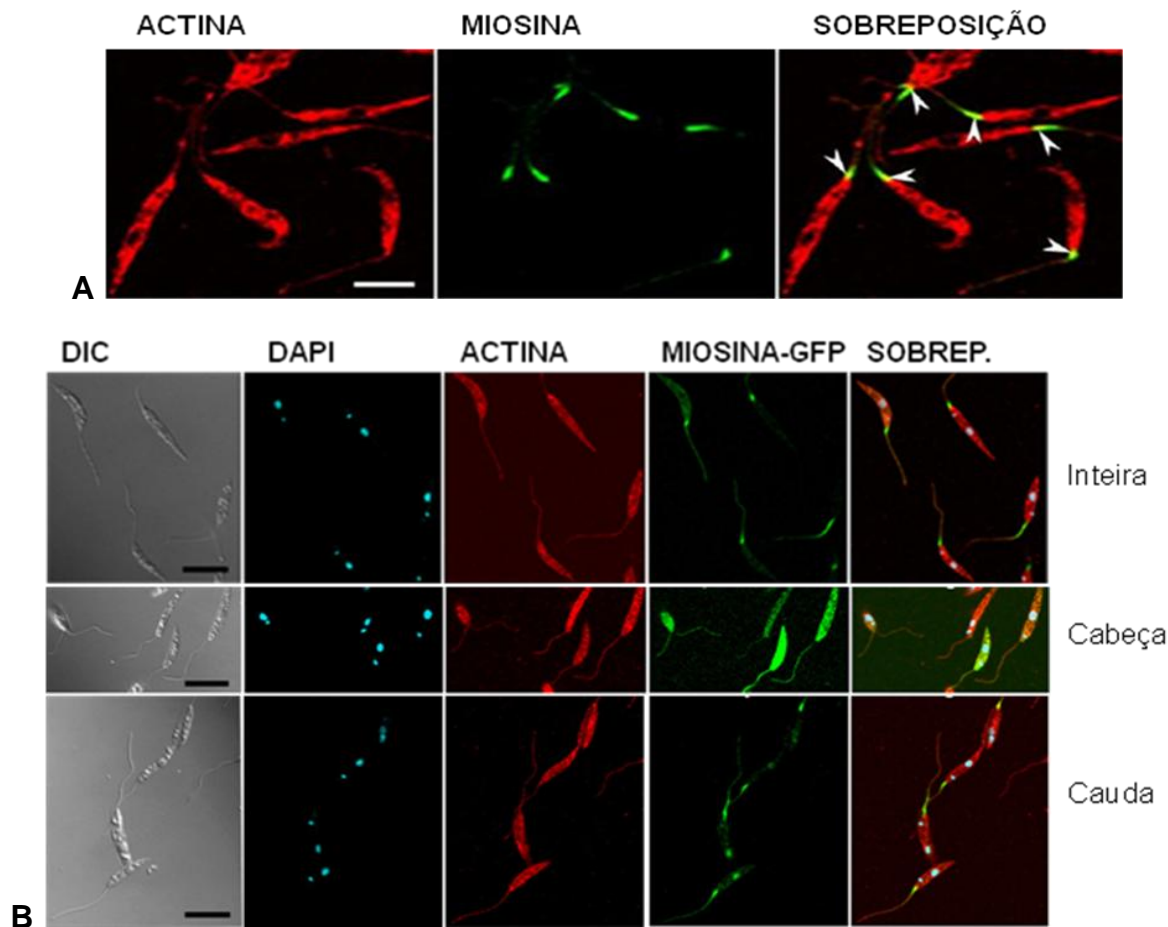


FIGURA 11 – LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DE ACTINA E MYO13 EM *L. donovani*
MODIFICADO DE: KATTA *et al.* (2009)

NOTA: as setas marcam a colocalização das proteínas na região basal do flagelo.

LEGENDA: **A**: localização com anticorpos anti-actina e anti-miosina; **B**: localização com anticorpos anti-actina e visualização da fluorescência da GFP conjugado às proteínas; DIC: contraste diferencial de fase; DAPI: coloração por DAPI para visualização do núcleo e cinetoplasto; ACTINA: imunofluorescência com anticorpos anti-actina; MIOSINA-GFP: localização da myo13 fusionada à etiqueta de GFP; SOBREP.: sobreposição ACTINA + MIOSINA-GFP

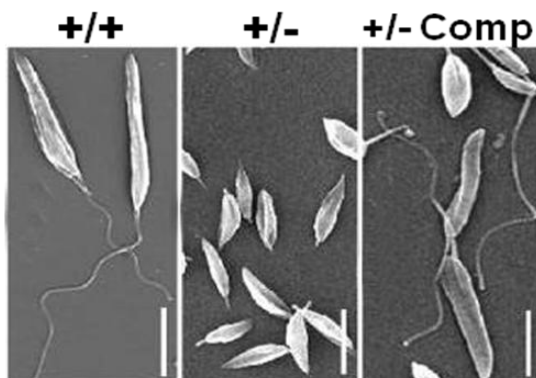


FIGURA 12 – ANÁLISE DO FORMATO CELULAR DE *L. donovani* COM A REMOÇÃO UM ALELO DA MYO13

FONTE: KATTA *et al.* (2010)

LEGENDA: +/+ : parasitas contendo os dois alelos da myo13; +/- : parasitas mutantes heterozigotos; +/-Comp: parasitas mutantes heterozigotos com complementação por Myo13-GFP

1.3 JUSTIFICATIVA

Os tripanossomatídeos são de grande importância para a saúde pública, além de terem se tornado importantes modelos de estudo, principalmente por se diferenciarem marcadamente de seus hospedeiros mamíferos em diversos processos biológicos, o que faz com que haja uma necessidade do estudo da biologia básica destes parasitas.

As miosinas exclusivas de *T. cruzi* ainda não foram estudadas, e a de tripanossomatídeos foi estudada apenas em outros organismos. A miosina de *T. cruzi* similar a de vários grupos filogenéticos (a de classe I), que embora tenha função estabelecida em outros organismos, possui peculiaridades e em tripanossomatídeos ela também deve ser investigada. Além disto, o esqueleto de actina de tripanossomatídeos ainda é bem pouco compreendido e a elucidação do papel que as miosinas exercem na célula vai contribuir para a definição do papel que os microfilamentos possuem neste grupo de organismos.

Além disso, a presença de miosinas exclusivas de *T. cruzi* e da miosina descrita como presente apenas em tripanossomatídeos, que não são similares às de mamíferos, as coloca como possíveis alvos de quimioterapia, uma vez que ainda não há drogas eficazes contra a doença de Chagas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo iniciar a caracterização das miosinas de classes I e XIII de *T. cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter anticorpos específicos contra os fragmentos proteicos das miosinas de classes I e XIII de *T. cruzi* inoculados em camundongos, produzidos a partir de fragmentos recombinantes em sistemas de produção heterólogos;
- b) Identificar a localização celular das miosinas em *T. cruzi* através de imunofluorescência utilizando o antissoro produzido;
- c) Identificar a localização celular das miosinas através da produção em *T. cruzi* de proteínas recombinantes fusionadas à etiqueta de proteína GFP;
- d) Analisar complexos proteicos obtidos através de imunoprecipitação;
- e) Analisar o fenótipo dominante negativo de *T. cruzi* após a superexpressão das caudas das miosinas;
- f) Analisar o fenótipo celular na ausência dos genes específicos obtidos através da deleção do gene por recombinação homóloga em *T. cruzi*;
- g) Analisar o fenótipo celular na diminuição da proteína por interferência de RNA em *T. brucei*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **Brometo de etídio:** solução 0,5 µg/mL.
- **Gel de corrida de poliacrilamida para eletroforese de proteínas:** acrilamida:bisacrilamida 33/0,9% na concentração desejada; 400 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,075% persulfato de amônio; 0,07% TEMED.
- **Gel de empilhamento de poliacrilamida para eletroforese de proteínas:** 4,75% de acrilamida 33/0,9%; 120 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,075% persulfato de amônio; 0,07% TEMED.
- **PBS 1X:** 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O; 137 mM NaCl.
- **Solução de acrilamida/bis-acrilamida (33/0,9%):** 33 g de acrilamida; 0,9 g de bisacrilamida; em 100 mL H₂O.
- **Solução de bloqueio para *western blot*:** 5% leite desnatado; 0,05% *Tween* 20 em PBS 1X.
- **Solução de coloração para SDS-PAGE azul de coomassie:** 0,1% azul de Coomassie R-250; 4,5% metanol; 10% ácido acético.
- **Solução de descoloração para SDS-PAGE:** 4% metanol; 7,5% ácido acético.
- **Solução de fixação de SDS-PAGE:** 40% etanol; 10% ácido acético.
- **Solução de coloração por prata:** 0,1% nitrato de prata.
- **Solução de revelação de prata:** 3% carbonato de sódio; 0,05% formaldeído.
- **Solução de sensibilização para coloração por prata:** 0,02% tiosulfato de sódio.
- **Solução de término de revelação de prata:** 40% etanol; 10% ácido acético.
- **Solução de lavagem para *western blot*:** 0,05% *Tween* 20 em PBS 1X.
- **Solução de Ponceau:** 0,5% Ponceau S; 1% ácido acético.

- **Solução hidratante:** 0,15 M NaCl; 4 mM NaH₂PO₄.
- **Tampão 2 M de ureia:** 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-base; 2 M ureia; 500 mM NaCl; 2% triton x-100.
- **Tampão 8 M de ureia:** 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-base; 8 M ureia.
- **Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6x:** Azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.
- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 4x:** 160 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 10% β-mercaptoetanol; 24% glicerol; 0,02% azul de bromofenol.
- **Tampão de corrida SDS-PAGE:** 25 mM Tris-base 25 mM; 192 mM glicina; 0,1% SDS.
- **Tampão de crosslinking para imunoprecipitação:** 0,2 M Dimetil pimelimidato em tampão de lavagem para imunoprecipitação.
- **Tampão de diluição para imunoprecipitação:** 1 mg/mL BSA em PBS 1x.
- **Tampão de lavagem para imunoprecipitação:** 0,2 M trietanolamina em PBS 1x.
- **Tampão de lavagem para restauração da resina:** 20 mM Tris pH 7,5; 1 M NaCl; 1 mM CaCl₂.
- **Tampão de eletroporação de *T. cruzi*:** 140 mM NaCl; 25 mM HEPES ácido; 0,74 mM Na₂HPO₄ pH 7,5.
- **Tampão de eluição:** 10 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM EDTA.
- **Tampão de equilíbrio da resina:** 20 mM Tris pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂.
- **Tampão de lise celular para *toothpick*:** glicerol 5 %; SDS 0,5 %; EDTA 5 mM; NaOH 50 mM; azul de bromofenol.
- **Tampão de lise desnaturante:** 40 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgSO₄; 1 mM CaCl₂; 1 % SDS; 10 mM β-mercaptoetanol; 1 mM PMSF; 10 μM E-64.
- **Tampão de lise hipotônica:** 100 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 2 mM CaCl₂.
- **Tampão de lise não desnaturante:** 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 137 mM NaCl; 10 % glicerol; 1% NP-40; 1 mM PMSF; 10 μM E-64.
- **Tampão de parada do crosslinking:** 0,05 M etanolamina em PBS 1x.
- **Tampão de revelação para fosfatase alcalina (AP Buffer):** 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂.

- **Tampão de sonicação:** 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 2 % triton x-100.
- **Tampão de transferência para *western blot* 1x:** 25 mM Tris-base; 192 mM glicina; 20% metanol.
- **Tampão TBE 1x:** 89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA.
- **Tampão TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0.
- **Tampão TELT:** 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA pH 9,0, 2,5 M LiCl; 4% Triton x-100.
- **Tampão ZPFM de eletroporação de *T. brucei*:** 192 mM NaCl; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 8 mM KCl; 8 mM NaH_2PO_4 ; 1,5 mM MgCl_2 ; 90 μM CaCl_2 ; 2,4 mM CH_3COONa pH 7,0.

3.2 PROCEDÊNCIA DOS REAGENTES

- **Abcam:** anticorpo policlonal anti-GFP.
- **Amersham Bioscience:** anticorpo monoclonal anti-histidina; dNTPs; membrana de nitrocelulose *Hybond*.
- **Appligene:** IPTG.
- **Becton Dickinson:** extrato de levedura.
- **BioRad:** azul de bromofenol.
- **Cult-Lab:** soro fetal bovino.
- **Difco:** triptose.
- **Fort Dodge:** cetamina; xilazina.
- **Gibco:** EDTA.
- **Invitrogen:** *1 Kb Plus DNA Ladder*; acrilamida; Alexa Fluor 488 anti-camundongo 2 mg/mL; *BenchMark™ Protein Ladder*; *BenchMark™ Pre-Stained*; bis-acrilamida; EDTA; enzima *Platinum® Taq High Fidelity*; enzima T4 DNA ligase; enzima *Taq* DNA polimerase; glicerol; IPTG; kit de clonagem *Gateway® pDEST™17*; kit de clonagem *Gateway® pDONR™221*; meio de cultura SDM-79; proteinase K; *Quant-iT Protein Assay Kit*; sacarose; solução 30% PEG 8000/30 mM MgCl_2 ; vetor *pDEST™17*; vetor *pDONR™221*.

- **Merck:** acetato de sódio; ácido acético; ácido bórico; ácido clorídrico; cloreto de cálcio; cloreto de magnésio; cloreto de potássio; cloreto de sódio; etanol absoluto; fosfato de potássio monobásico; fosfato dibásico de sódio; glicose; hidróxido de sódio; SDS; sulfato de amônio; triethanolamine.
- **Midland Certified:** oligonucleotídeos.
- **New England Biolabs:** endonucleases de restrição *NotI*-HF e *XcmI*; *NEBuffers*;
- **Polysciences:** tween 20.
- **Promega:** 1 Kb DNA *Ladder*; BCIP (*Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate*); fosfatase alcalina; NBT (*NitroBlue Tetrazolium*).
- **Qiagen:** *QIAprep Spin Miniprep Kit*.
- **RDI-Fitzgerald:** anticorpo monoclonal anti-*c-myc*.
- **Roche:** *Anti-Protein C Affinity Matrix*; *High Pure PCR Product Purification Kit*; *Protease Inhibitor Cocktail Tablets*.
- **SERVA Electrophoresis:** Alu-Gel-S.
- **Sigma-Aldrich:** adjuvante completo de Freund; agarose; ampicilina; anticorpo anti-camundongo conjugado à fosfatase alcalina; anticorpo anti-coelho conjugado à fosfatase alcalina; azul de Coomassie R-250; β -mercaptoetanol; brometo de etídeo; BSA; canamicina; cloranfenicol; DAPI; dimethyl pimelimidate; E-64; ethanolamine; G418; HEPES; membrana de diálise; nitrato de prata; Nonidet P-40 (NP-40); paraformaldeído; poli-L-lisina; Ponceau S; PMSF; resina proteína G sepharose; TEMED; Triton x-100.
- **Stratagene:** *Pfu* DNA polimerase.
- **Vetec:** glicina; metanol.
- **USB:** persulfato de amônio; Tris-base; ureia.

3.3 MEIOS DE CULTURA

- **Meio LB (*Luria Bertani*):** 10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 5g/L NaCl.
- **Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) acrescido de penicilina:** 15 g/L extrato

de levedura; 11,56 g/L fosfato dibásico de sódio; 2,2 g/L glicose; 0,02 g/L hemina; 5 g/L infuso de fígado; 0,4 g/L KCl; 4,4 g/L NaCl; 10% (v/v) soro fetal bovino; 5 g/L triptose; 63 mg/L penicilina. pH 7,2 ajustado com HCl.

- **Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*):** 2 mM CaCl_2 ; 17 mM KCl; 2 mM MgCl_2 ; 190 mM NaCl; 8 mM tampão fosfato pH 6,0.
- **Meio TAU3AAG:** meio TAU suplementado com 10 mM L-prolina 10; 50 mM glutamato sódico; 2 mM aspartato sódico; 10 mM glicose.

3.4 ORGANISMOS UTILIZADOS

- Bactéria *Escherichia coli* cepas DH5 α , BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS
- *Mus musculus* linhagem Swiss
- Protozoário *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c
- Protozoário *Trypanosoma brucei* cepa 29-13

3.5 CULTURAS DE PARASITAS

3.5.1 Culturas de *T. cruzi*

Para obtenção do DNA genômico, do extrato proteico, assim como de parasitas íntegros, foi utilizado o clone Dm28c (*Didelphis marsupialis*) de *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1985; CONTRERAS *et al.*, 1988). As formas epimastigotas foram mantidas em cultura axênica a 28°C em meio LIT (CAMARGO, 1964), repicadas a cada três dias mediante inóculos de 1×10^6 células/mL.

As formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação *in vitro* (BONALDO *et al.*, 1988). Formas epimastigotas em final de fase logarítmica de crescimento (densidade celular entre $5 - 7 \times 10^7$ células/mL) foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g, por 5 minutos, e ressuspensas em meio TAU, na

concentração de 5×10^8 células/mL e mantidas a 28°C por 2 horas. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 75 cm² contendo 50 mL de meio TAU3AAG (concentração final de 5×10^6 células/mL). Uma proporção dos parasitas que se aderiram à superfície da garrafa de cultivo se diferenciou em metacíclicos, os quais foram liberados no sobrenadante (BONALDO *et al.*, 1988) e utilizados nos ensaios.

3.5.2 Culturas de *T. brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei*, Lister 427, (CROSS e MANNING, 1973) foram mantidas em cultura axênica a 28 °C em meio SDM-79 (BRUN e SCHONENBERGER, 1979) suplementado com penicilina e 10% de soro fetal bovino e repicados a cada três dias mediante inóculos de 1×10^6 células/mL. Para os experimentos de interferência, foi utilizada a cepa 29-13 (WIRTZ *et al.*, 1998) de *T. brucei* (cepa recombinante que expressa repressor *tet* e o gene da T7 RNA polimerase), mantida da mesma forma que a selvagem, com a suplementação de 50 µg/mL higromicina e 15 µg/mL G418.

3.5.3 Obtenção do extrato proteico dos parasitas

3.5.3.1 Extrato total para eletroforese

Os parasitas foram centrifugados 7.000 x g por 5 minutos a 4°C, ressuspensos na metade do volume da cultura de PBS 1x e centrifugados nas mesmas condições por duas vezes. Os parasitas foram então ressuspensos em 1 mM PMSF + 10 µM E-64 em PBS 1x no volume necessário para que a densidade ficasse em $1,33 \times 10^6$ células/µl e aliquotados em 75 µl por tubo. Em seguida, foi adicionado 25 µl de TA 4x por tubo, as amostras foram imediatamente aquecidas a 99°C por 5 minutos e colocadas no gelo por 15 minutos. Nos casos em que a

amostra ficou viscosa, ela foi submetida a sonicação (Ultrasonic Homogenizer, Cole Parmer, 4710 series) em potência 2 por 3 segundos, e, se necessário, foi novamente aquecida a 99°C por 5 minutos e colocada no gelo por 15 minutos.

3.5.3.2 Extratos nativo e desnaturado para imunoprecipitação

Os parasitas foram centrifugados 7.000 x g por 5 minutos a 4°C, ressuspensos na metade do volume da cultura de PBS 1x e centrifugados nas mesmas condições por duas vezes. Os parasitas foram então ressuspensos em 2 mL de PBS 1x para separação em dois tubos, que foram novamente centrifugados nas mesmas condições. Para cada 100 mL de cultura inicial foi utilizado 1 mL de cada tampão de lise. Um precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de tampão de lise não desnaturante e o outro foi ressuspenso em 1 mL de tampão de lise desnaturante. Ao extrato desnaturado, foi adicionado 5 µL de DNase. O extrato nativo ficou por 2 horas agitando a 4°C e depois foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm a 4°C e foi recuperado o sobrenadante. As amostras foram armazenadas a -70°C.

3.5.4 Extração de DNA dos parasitas

Epimastigotas (1×10^7 células) foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g por 5 min, lavadas em PBS e ressuspensas em 350 µL de tampão TELT. Após 5 min de incubação, à temperatura ambiente, foi adicionado à amostra 1 volume de fenol/clorofórmio e o material foi centrifugado a 13.000 x g por 5 min. A fase aquosa foi recolhida e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, coletado com auxílio de uma pipeta e transferido para um tubo de 1,5 mL. O DNA foi lavado com etanol 70% 5 vezes, seco e em seguida ressuspenso em tampão TE contendo RNase a 20 µg/mL.

3.6 SELEÇÃO DOS GENES

Para este trabalho, foram selecionados em *T. cruzi* e em *T. brucei* os dois genes de miosinas comuns aos tripanossomatídeos: a miosina de classe I (myo1), comum a quase todos os organismos eucarióticos, e a miosina de classe XIII (myo13), exclusiva dos tripanossomatídeos (TABELA 1).

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO DOS GENES SELECIONADOS

Gene	ID no banco de dados*	Tamanho (em pares de bases)	Posição do término da cabeça
TcMyo1	TcCLB.507739.110	3498	2079
TcMyo13	TcCLB.511527.70	3177	2322
TbMyo1	Tb927.4.3380	3501	2100
TbMyo13	Tb11.01.7990	3177	2235

Nota: *Identificação do gene no banco de dados www.genedb.org.

3.7 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados, com o auxílio do PrimerSelect do Software Lasergene (DNASTAR, Inc.), com base no banco de dados do GeneDB – *The Wellcome Trus Sanger Institute* (disponível no site <http://www.genedb.org>).

Para a clonagem das sequências codificadoras de proteínas, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores (“*forward*” - F e “*reverse*” – R) para obter a CDS (região codificadora de proteína) completa de cada gene, um par de oligonucleotídeos para a região “cabeça” e outro par para a região “cauda” de cada gene de miosina de *T. cruzi*. A região da cabeça é definida pela sua sequência inserida no banco de dados e, para a amplificação desta região, o oligonucleotídeo R foi desenhado para se anelar a 30 nucleotídeos após o final da cabeça, enquanto o oligonucleotídeo F da cauda foi desenhado para se anelar a 30 nucleotídeos antes do início da cauda. Para a inserção dos genes no vetor pDONRTM221, na extremidade 5’ de cada iniciador foi inserida uma sequência conservada,

denominada sequência *attB*, responsável pela recombinação do produto de PCR ao vetor de entrada pDONRTM221 da plataforma *Gateway*® (TABELA 2).

TABELA 2 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA CLONAR AS CDS COMPLETAS E OS FRAGMENTOS “CABEÇA” E “CAUDA” DE CADA GENE

Oligonucleotídeo	Sequência
TcMyo1 inteira F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCATGTGTTGATTTTAAGAAAGTC
TcMyo1 inteira R	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CAACCGATACCATGTTGATCTTTTC
TcMyo1 cabeça F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGGCATGTGTTGATTTTAAG
TcMyo1 cabeça R	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CGCCTCAAGTGTGAATAGGTGC
TcMyo1 cauda F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC CAAGTTGGGCCAGCAAAAAG
TcMyo1 cauda R	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CAACCGATACCATGTTGATC
TcMyo13 inteira F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGAATGAACCGGCAATTGAGC
TcMyo13 inteira R	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CATGAAACGGGAGGAAACAC
TcMyo13 cabeça F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGAATGAACCGGCAATTGAG
TcMyo13 cabeça R	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CCGCAAGACGCTTTTGTCC
TcMyo13 cauda F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC CGCTGCGTGCCTTTTCTG
TcMyo13 cauda R	GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCT CATGAAACGGGAGGAAACAC

NOTA: em negrito, a região de complementariedade para clonagem no vetor de entrada pDONRTM221; em vermelho o códon de início da tradução da proteína; em azul o códon de término da tradução da proteína.

Para os experimentos de interferência de RNA, foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para cada gene de miosina de *T. brucei* (myo1 A e B e myo13 A e B), gerando produtos de aproximadamente 400 pb (pares de base) cada. Aos oligonucleotídeos F foi adicionada a sequência de restrição para a enzima BamHI, e aos oligonucleotídeos R foi adicionada a sequência de restrição para a enzima HindIII (TABELA 3).

TABELA 3 – SEQUENCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA CLONAR NO VETOR p2T7-177 PARA INDUÇÃO DE INTERFERÊNCIA DE RNA EM *T. brucei*

Oligonucleotídeo	Sequência
Myo1 A F	CGCGGATCCCAAGGCGTCAAAAGTGCGG
Myo1 A R	CCCAGCTTCCGGAATGGGGGCAGAA
Myo1 B F	CGCGGATCCCAAGCTAACGCCTGCGACGAAGAA
Myo1 B R	CCCAGCTTGCCTGCCGCGCTGCTCT
Myo13 A F	CGCGGATCCGGGCTTCACTTGAGAGGTTGCTGCT
Myo13 A R	CCCAGCTTAGAACTTCTCAATGATCTGCTGCCGC
Myo13 B F	CGCGGATCCGACTAGCGGGCTGTGACGA
Myo13 B R	CCCAGCTTGCATTCTTCGCTTCTCCTT

NOTA: Em laranja está a sequência de restrição para a enzima BamHI (GGATCC) e em verde está a sequência de restrição para a enzima HindIII (AAGCTT).

Para o nocaute gênico em *T. cruzi*, foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para cada gene, um par para amplificar

aproximadamente 500 pb da região a montante do gene, e outro par para amplificar aproximadamente 500 pb da região a jusante do gene. À região 5' dos oligonucleotídeos iniciadores R da região montante e F da região jusante foi adicionada uma sequência com 20 pb complementares às extremidades de uma sequência contendo duas regiões intergênicas ladeando o gene de resistência à neomicina ou à higromicina (TABELA 4). A fim de facilitar a identificação das regiões a montante e a jusante de cada gene, a região a montante será chamada de *UP* e a região a jusante será chamada de *DOWN*. O cassete contendo a região intergênica entre os genes Kap3 e Enolase e intergênica entre as cópias de GAPDH flanqueando o gene para resistência à Neomicina ou à Higromicina foram amplificados a partir do vetor pNeo2 e pHig2, construídos no instituto, utilizando os oligonucleotídeos KOK7 F e KOK7 R.

TABELA 4 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA AMPLIFICAR AS REGIÕES QUE SERÃO UTILIZADAS PARA REALIZAR O NOCAUTE GÊNICO

oligonucleotídeo	Sequência
Myo1 UP F	AAATCCTGATAATAACGAATTCACCTTC
Myo1 UP R	AGTGC GAAAGAGAAAT GACGGTGCATTT CTTCCCAAATCGAGAACTGTTGTCATTTC
Myo1 DOWN F	ACATTGAACAGAATTTA ACAT GCCCCATCAAT CGTGACGGAAGGGGGTTT
Myo1 DOWN R	AAGCAAACGGAGAGGCAAAG
Myo13 UP F	GCTGAGGTGCGCTGCAATG
Myo13 UP R	AGTGC GAAAGAGAAAT GACGGTGCATTT AATTGCCGGTTCATTCACATTTTC
Myo13 DOWN F	ACATTGAACAGAATTTA ACAT GCCCCATCAAC GACGGAATAACTCTTCTCTC
Myo13 DOWN R	AAGGTGGATGTTGTGCCCAAC
KOK7 F	AAATGCACCGTCCATTTCTCTTCCGCACT
KOK7 R	TTGATGGGCATGTTAAATTCTGTTCAATGT

NOTA: em negrito estão as regiões complementares às extremidades do cassete de resistência.

3.8 AMPLIFICAÇÃO A PARTIR DE REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE

A fim de se obter os produtos gênicos utilizados para as clonagens, foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) a partir do DNA genômico para cada sequência desejada. As PCRs foram feitas, em volume de 50 µl, utilizando uma das seguintes enzimas de alta fidelidade: 2,5 unidades de *Pfu* DNA polimerase em 1x tampão *Pfu*, 0,2 mM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador e 20 ng do DNA genômico extraído de *T. cruzi* ou 2,5 unidades de Platinum® *Taq* DNA polimerase

High Fidelity em 1x tampão Platinum® *Taq High Fidelity*, 20 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgSO_4 e 200 nM de cada iniciador. O programa inicial da PCR foi de: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 50°C por 30 segundos (anelamento) e 72° C para as enzimas *Pfu* e *Pfx* ou 68°C para a enzima Platinum® *Taq High Fidelity* por um tempo que variou de acordo com o tamanho da sequência a ser amplificada, seguindo o princípio de 2 minutos para cada mil pares de bases, quando utilizada a enzima *Pfu*, e 1 minuto para cada mil pares de bases quando utilizadas as outras enzimas (extensão). Após o ciclo de repetição, as reações foram mantidas por 10 minutos a 72°C ou 68°C.

As amostras cuja PCR forneceram única banda do tamanho esperado foram clonadas no vetor de entrada. As PCRs de amostras que não tiveram sequências amplificadas ou que tiveram mais do que uma sequência amplificada, pela observação de diferentes bandas em gel de agarose, foram refeitas com outras condições de temperatura de anelamento e/ou tempo de extensão. Como maior temperatura de anelamento significa maior especificidade pelos oligonucleotídeos iniciadores, nos casos em que houve mais do que uma sequência amplificada, a temperatura de anelamento foi aumentada até amplificação de uma única sequência. Nos casos em que não houve amplificação, a temperatura de anelamento foi diminuída até amplificação da sequência desejada.

Quando o objetivo foi a verificação da presença do inserto no vetor, a PCR foi realizada utilizando 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 1x tampão *Taq*, entre 1 e 2 ng do vetor purificado, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP e 500 nM de cada iniciador em 10 µl de volume final. A solução foi aquecida a 94°C por 2 minutos, passou por 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, mesma temperatura de anelamento utilizada na primeira PCR durante 30 segundos e 72°C por um tempo que variou de acordo com o número de pares de bases (1 minuto para cada 1000 pb) e, permaneceu por 10 minutos a 72°C.

3.9 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As eletroforeses de DNA foram realizadas em géis de agarose em sistema horizontal conforme descrito por Sambrook e cols. (1989). As amostras foram

diluídas em tampão de amostra de DNA e aplicadas em gel de agarose com concentração variada – entre 0,8% e 1% (m/v), de acordo com a amostra aplicada – e foi aplicado também o padrão de massa molecular (1 Kb *Plus* ou 1 Kb DNA *Ladder*). Os géis de agarose foram preparados em tampão TBE 0,5x nas concentrações desejadas e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão, a 100 V durante tempo variável. O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação.

3.10 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR POR PEG

Aos 50 µL do produto de PCR, foram adicionados 150 µL de tampão TE pH 8,0 e 100 µL de PEG 30% 8000/30 mM MgCl₂. A solução foi centrifugada por 10 min 15.000 x g e o excesso do sobrenadante foi descartado. Para eliminar o máximo possível de solução, o tubo ficou aproximadamente 1 hora a 65°C e o sedimento foi então ressuspenso em 10 µL de tampão TE pH 8,0.

3.11 CLONAGEM NA PLATAFORMA GATEWAY® (INVITROGEN)

3.11.1 Geração de clones de entrada para a plataforma Gateway®

Os produtos de PCR foram clonados no vetor de entrada da plataforma Gateway® pDONRTM221, ilustrado na figura 13, através da reação de recombinação mostrada na figura 14. Para a recombinação, foram utilizados 50 fmol do produto de PCR, 150 ng do vetor pDONRTM221 e 1 µL do mix da enzima BP ClonaseTM II. Após 16 horas de incubação a 25°C, adicionou-se 1 µL de solução de proteinase K e as amostras foram incubadas por 10 minutos a 37°C para parar a reação.

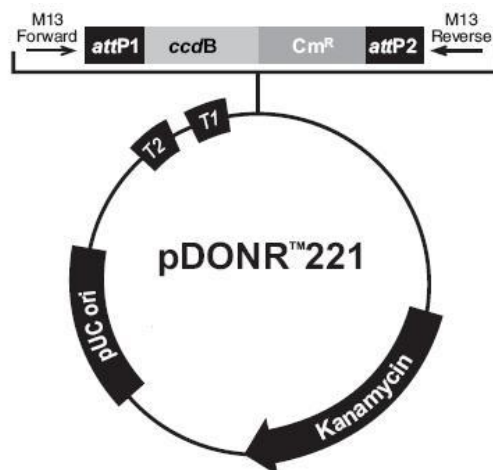


FIGURA 13 – MAPA DO VETOR DE ENTRADA pDONR™221

FONTE: <http://www.invitrogen.com>

LEGENDA: M13 *Forward* e M13 *Reverse*: sítios com sequências de ligação destes oligonucleotídeos para sequenciamento; *attP1* e *attP2*: sequências de dna derivadas do bacteriófago λ que permitem clonagem por recombinação do gene de interesse de um clone de expressão Gateway® ou produto de PCR *attB*; *ccdB*: gene que permite a seleção negativa do plasmídeo; *Cm^R*: gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol; kanamycin: gene de resistência ao antibiótico canamicina; pUC ori: possibilita replicação em alta cópia; T1 E T2: sequências terminadoras de transcrição



FIGURA 14 – ESQUEMA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO ENTRE O PRODUTO DE PCR E O VETOR DOADOR

MODIFICADO DE <http://www.invitrogen.com>

NOTA: Esquema da reação de recombinação entre o produto de pcr contendo o sítio *attB* e o vetor doador contendo o sítio *attP*, catalisada pela enzima BP CLONASE II™. A reação gera o clone de entrada onde o produto de pcr está inserido no vetor entre os sítios *attL* para recombinação com o vetor de destinação.

3.11.2 Geração de clones de expressão usando a reação de recombinação LR

O inserto presente do vetor de entrada foi recombinado para o vetor de destinação através da reação de recombinação LR. Foram utilizados o vetor pDESTTM17 (FIGURA 15) para expressão da proteína recombinante em sistemas de expressão heteróloga e vetores da plataforma pTcGW (FIGURA 16) para expressão da proteína em *T. cruzi* fusionada à diferentes etiquetas em sua extremidade N-terminal.

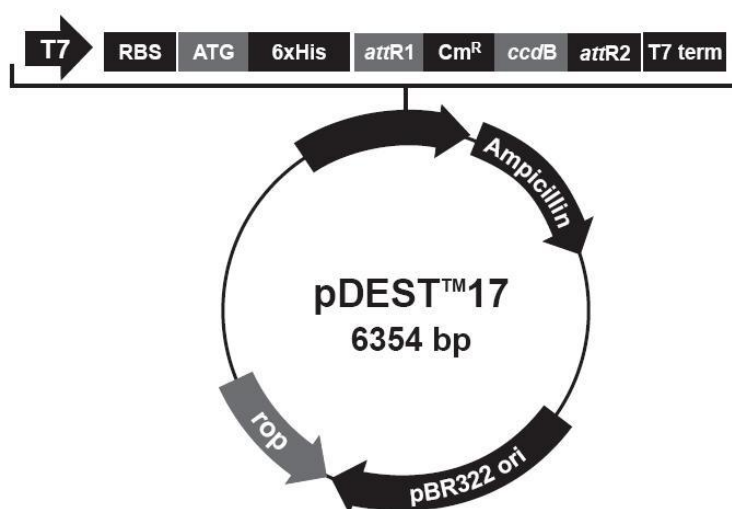


FIGURA 15 – MAPA DO VETOR pDESTTM17

FONTE: <http://www.invitrogen.com>

LEGENDA: T7: promotor para T7 RNA polimerase; RBS: sequência Shine-Dalgarno; ATG: códon de início da tradução; 6XHIS: região codificadora de seis histidinas; attR1 E attR2: seqUências de recombinação derivadas do bacteriófago λ que permite a recombinação do gene no vetor; CmR: gene de resistência ao cloranfenicol para contra-seleção do plasmídeo; ccdB: gene que codifica uma proteína citotóxica, sendo letal para a bactéria, o que evita que cresçam colônias com o vetor sem o gene de interesse; T7 TERM: sequência que permite o término da transcrição; AMPICILLIN: gene de resistência ao antibiótico ampicilina; pBR322 ori: origem da replicação para duplicação do dna e manutenção do plasmídeo; ROP: interage com a origem PBR322 para facilitar a baixa taxa de replicação em *E. coli*

As seqUências codificadoras das cabeças e caudas das miosinas foram recombinadas do vetor de entrada para o vetor pDESTTM17 a fim de serem expressas em bactérias *E. coli* para que as respectivas proteínas fossem purificadas e posteriormente inoculadas em camundongos para a produção de anticorpos.

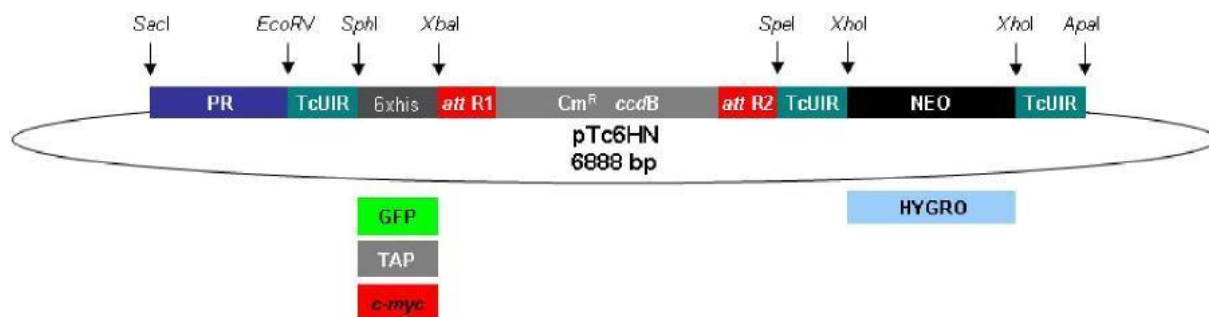


FIGURA 16 – DESENHO ESQUEMÁTICO DOS VETORES DA PLATAFORMA pTcGW
MODIFICADO DE: BATISTA *et al.* (2010)

NOTA: Esquema dos vetores exemplificado pelo vetor pTc6HN, que contém a etiqueta de seis histidinas. Acima do vetor estão os sítios para endonucleases de restrição.

LEGENDA: PR: promotor ribossomal; TcUIR: região intergênica de *T. cruzi* do locus da ubiquitina; att R1 e att R2: sítios de recombinação da plataforma Gateway®; Cm^R: gene de resistência à cloranfenicol; ccdB: gene para seleção negativa durante a clonagem; NEO e HYGRO: genes de resistência à neomicina e higromicina, respectivamente, para seleção de parasitas transfectados; 6xhis, GFP, TAP e c-myc: etiquetas de fusão de 6 histidinas, GFP, TAP e c-myc.

As CDS das miosinas foram recombinadas do vetor de entrada para vetores da plataforma pTcGW, que foram construídos em nosso laboratório a partir do vetor pBluescript(r) II para expressão em *T. cruzi* da proteína de interesse fusionada à diferentes etiquetas: pTcGFPN para expressão da proteína fusionada à etiqueta GFP (*green fluorescent protein*) na extremidade N-terminal, para localização celular através da emissão de luz verde pela proteína GFP; pTcPTP, uma variação da etiqueta TAP (*tandem affinity purification*) na extremidade N-terminal para realização de ensaio de imunoprecipitação com anticorpos anti-proteína C, presente na etiqueta PTP; e pTcMYCN para expressão da proteína fusionada ao epítipo c-myc na extremidade N-terminal (BATISTA *et al.*, 2010). As sequências codificadoras das caudas das miosinas também foram recombinadas do vetor de entrada para o vetor pTcGFPN para verificar se haveria mudança na localização das proteínas e se ocorreria algum efeito fenotípico decorrente de um dominante negativo.

A reação de recombinação LR, representada pela figura 17, foi realizada utilizando 150 ng do clone de entrada purificado, 150 ng do vetor de destinação e 2 µL da enzima LR Clonase™ II. Após 16 horas a 25°C, adicionou-se 1 µL de solução de Proteinase K para interromper a reação e incubou-se por 10 minutos a 37°C.

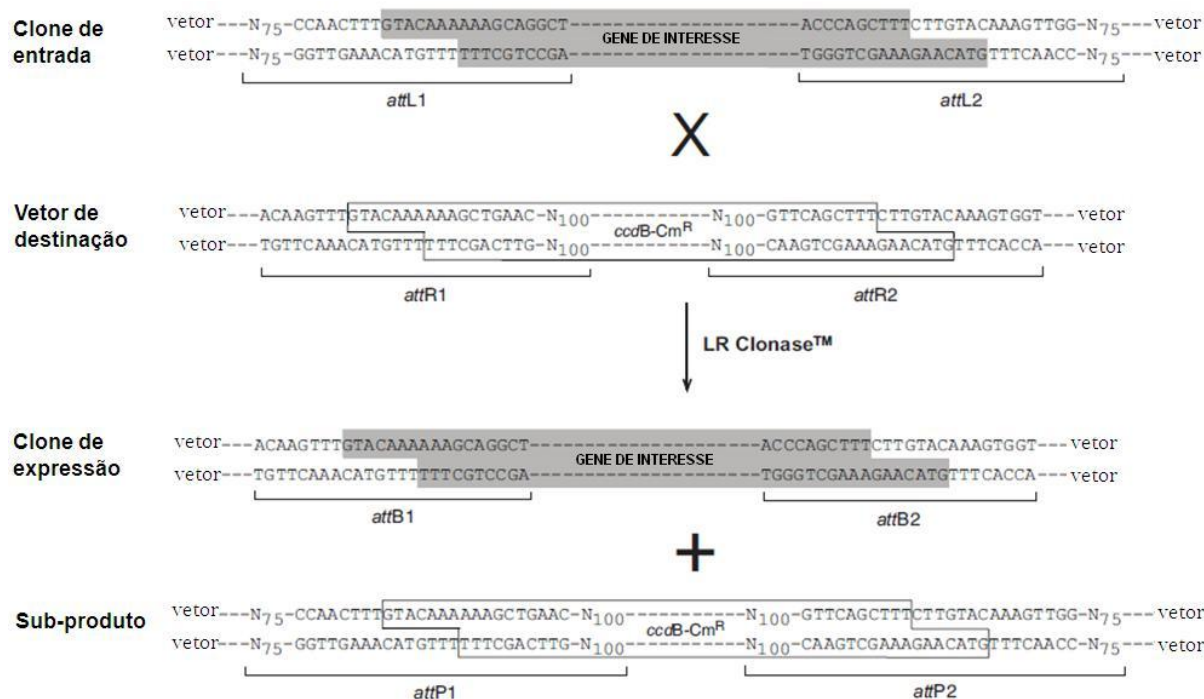


FIGURA 17 – ESQUEMA DA REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO ENTRE O CLONE DE ENTRADA E O VETOR DE DESTINAÇÃO

MODIFICADO DE <http://www.invitrogen.com>

NOTA: Esquema da reação de recombinação entre o clone de entrada contendo o sítio *attL* e o vetor de destinação contendo o sítio *attB*, catalisada pela enzima LR CLONASE II™. A reação gera o clone de expressão para a expressão proteica no sistema adequado.

3.12 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS CÁLCIO-COMPETENTES

3.12.1 Preparação de bactérias cálcio-competentes

Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5,0 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado para a cepa. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas sob agitação de 200 rpm. Foi realizado um novo inóculo na proporção 1:100, com 1 mL desta cultura em 99 mL de meio LB, e foi novamente incubado a 37°C sob agitação 200 rpm até o início da fase de crescimento exponencial, que foi estimada através da densidade ótica₆₀₀ entre 0,4 e 0,6 (aproximadamente 3 horas).

Após o crescimento, as células foram resfriadas no gelo por 35 minutos. A partir desse ponto todas as etapas foram feitas a 4°C. A cultura foi centrifugada a 4.000 x g, por 5 minutos, a 4°C, e as células foram ressuspensas em 50 mL de 100

mM CaCl_2 10 mM HEPES pH7,0 gelado e estéril e mantidas no gelo durante 30 minutos para então serem submetidas à uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de 100 mM CaCl_2 10 mM HEPES pH 7,0 glicerol 10%. As células foram aliqotadas e estocadas a -70°C .

3.12.2 Transformação por choque térmico

Diferentes cepas da bactéria *E. coli* foram utilizadas, dependendo da necessidade de cada momento. Quando o objetivo foi a propagação de plasmídeos, utilizou-se a cepa DH5- α , e quando o objetivo foi a expressão de proteína recombinante, diferentes cepas foram utilizadas: BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS.

As transformações consistiram na adição de 5 μL da reação de recombinação ou aproximadamente 100 ng do plasmídeo purificado em 50 μL de célula cálcio-competente, então realizou-se o choque térmico que consistiu de incubação por 30 minutos das amostras em gelo, incubação por 1,5 minutos a 42°C e incubação novamente no gelo por mais 2 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB e as células permaneceram por 1 hora a 37°C sob agitação 200 – 220 rpm.

Quando o objetivo foi a propagação ou purificação dos plasmídeos, as células foram cultivadas em placas contendo o meio LB-ágar com 50 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico canamicina (para o vetor pDONRTM221) ou 100 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico ampicilina (para o vetor pDESTTM17). Para a garantia de que haveria uma quantidade adequada de colônias na placa, em uma placa foi plaqueado 200 μL de células e o restante foi centrifugado por 4 minutos a $6.000 \times g$, o sobrenadante foi descartado restando cerca de 100 μL de meio de cultura no tubo que foi utilizado para ressuspender o restante de células que foi então plaqueado em outra placa. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 16 horas.

Quando o objetivo foi a expressão protéica, as células foram transferidas para meio LB líquido contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ do antibiótico ampicilina e mais o antibiótico da cepa quando necessário, gerando o pré-inóculo, que foi mantido por 16 horas a 37°C sob agitação 200 – 220 rpm.

3.13 SELEÇÃO DE CLONES POSITIVOS POR *TOOTHPICK*

A técnica de *toothpick* permite uma análise rápida de fragmentos de DNA clonados em plasmídeos pela visualização do tamanho do clone em comparação com uma amostra controle. Com palitos de madeira estéreis, as colônias foram parcialmente removidas da placa de cultura e transferidas para o fundo de um tubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 15 µL de tampão de lise para *toothpick*. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 65 °C sob agitação de 600 rpm e aplicadas em gel de agarose 0,8% não completamente submerso no tampão TBE 0,5x. Como controle, foi utilizado aproximadamente 100 ~ 150 ng de solução do vetor não recombinado.

3.14 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a expressão das proteínas recombinantes, o plasmídeo pDEST™17 foi transformado em bactéria *E. coli* cálcio-competente para expressão heteróloga e foi feita indução da expressão com IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside).

Antes da expressão em grande quantidade, foi feito um teste para verificar se o gene clonado era capaz de expressar uma proteína. Para o teste de expressão, foi feita uma diluição 1:10 do pré-inóculo em 5 mL de meio de cultura com 100 µg/mL do antibiótico ampicilina mais o antibiótico específico para a cepa, quando necessário, gerando o inóculo que foi mantido a 37°C sob agitação 200 - 220 rpm até que a densidade ótica₆₀₀ estivesse em entre 0,6 e 0,8 (aproximadamente 1,5 horas). Neste momento, foi retirado 2 mL de cultura para a indução da expressão com 1 mM de IPTG por 2 horas a 37°C e o restante da cultura permaneceu crescendo sem a adição de IPTG para controle negativo da expressão. Após o tempo de indução, todas as culturas foram centrifugadas por 10 min a 5.000 x g e o sedimentado foi ressuspensão em 1 mL de PBS 1x para ser novamente centrifugado por 10 min a 5.000 x g, e o processo de ressuspensão em PBS e centrifugação se repetiu por mais uma vez. O sedimento foi então ressuspensão em 120 µL de tampão de amostra 4x, as amostras foram *vortexadas* e mantidas por 5 minutos a 95°C

seguindo para o gelo para mais 5 minutos, para serem então analisado por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida (8-13%) corado com azul de coomassie. Para confirmação da expressão da proteína, foi realizado *western blot* utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-histidina contra a proteína recombinante imobilizada em membrana de nitrocelulose. O anticorpo reconhece a etiqueta de 6 histidinas fusionadas à porção N-terminal da proteína, adicionada pelo vetor de expressão.

Quando confirmada a expressão da proteína recombinante em *E. coli*, o procedimento foi repetido em 300 mL de meio de cultura, para obtenção de quantidade suficiente de proteína para as inoculações em camundongos. O procedimento para indução da expressão é o mesmo do teste de expressão, mas neste caso, o pré-inóculo foi realizado em 30 mL de meio de cultura, e o inóculo em 300 mL de cultura. Quando a densidade ótica₆₀₀ ficou entre 0,6 e 0,8, foi retirado 2 mL para controle não induzido, e foi adicionado 1 mM de IPTG no restante da cultura.

Após o tempo de expressão, as culturas induzida e não induzida foram centrifugadas por 10 minutos 5.000 x g 4°C. O sedimentado da cultura não induzida foi ressuspenso em 1 mL de PBS 1x e o sedimento da cultura induzida foi ressuspenso em 100 mL de PBS 1x, foi centrifugado nas mesmas condições e as etapas de ressuspensão em PBS 1x e centrifugação se repetiu por mais uma vez. O sedimentado da cultura não induzida foi ressuspenso em 120 µL de tampão de amostra 4x e o sedimentado da cultura induzida foi ressuspenso em 15 mL de tampão de sonicação, que foi sonicado por 4 pulsos de 15 segundos a potência 8, com intervalo de 1 minuto entre os pulsos, para lise das células. Foi retirado 75 µL desta solução e foi adicionado 25 µL de tampão de amostra 4x, esta amostra foi identificada como fração total, pois contém todas as proteínas presente na célula.

A amostra com as células lisadas foi então centrifugada por 10 minutos 10.000 x g 4°C, separando assim as proteínas solúveis e insolúveis. O sobrenadante foi armazenado e identificado como fração solúvel, por conter as proteínas solúveis das células. Foi retirada uma alíquota de 75 µL da fração solúvel e foi adicionado 25 µL de tampão de amostra 4x. Com uma ponteira de micropipeta, foi retirado um pouco do sedimentado onde estavam as proteínas insolúveis e foi adicionado 100 µL de tampão de amostra 4x. O restante do sedimentado foi ressuspenso com 15 mL de 2 M ureia e novamente sonicado e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi armazenado e identificado como primeiro lavado 2 M ureia, e uma

alíquota de 75 µL foi retirado e adicionado 25 µL de tampão de amostra 4x. O sedimentado foi novamente ressuspensionado em 15 mL de tampão 2 M ureia e os passos seguintes foram repetidos, gerando o segundo lavado 2 M ureia. O sedimentado foi então ressuspensionado em tampão desnaturante 8 M ureia, que foi novamente sonificado e centrifugado nas mesmas condições, gerando a amostra solubilizada em 8 M ureia, e o sedimentado desta etapa foi descartado.

Sendo assim, diferentes frações de proteínas foram obtidas: não induzida, fração total, solúvel, insolúvel, frações provenientes de lavagem em tampão com ureia 2 M e fração solubilizada em tampão com ureia 8 M. As alíquotas contendo tampão de amostra 4x das amostras não induzida, solúvel e insolúvel foram mantidas por 5 minutos a 95° C e transferidas para o gelo por mais 5 minutos.

3.15 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

As proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE sob condições desnaturantes, conforme descrito por HAMES e RICKWOOD (1990). A concentração da poliacrilamida variou entre 8% e 13%, de acordo com o tamanho da proteína analisada: 8% para as proteínas de alto peso molecular (acima de 100 kDa), 10% para as proteínas de médio peso molecular (entre 50 e 100 kDa) e 13% para as proteínas de baixo peso molecular (menos do que 50 kDa).

No gel foi aplicado um volume que variou dependendo da amostra e 5 µL do marcador de peso molecular *BenchMark*TM. O gel foi submerso em tampão de corrida para SDS-PAGE e foi aplicada corrente elétrica de 30 mA por aproximadamente 90 minutos.

3.15.1 Coloração com azul de coomassie

Para a visualização dos resultados obtidos por SDS-PAGE, ao final da corrida eletroforética, o gel permaneceu por 30 minutos no corante azul de coomassie e depois foi transferido para solução de descoloração, para eliminação

do excesso de corante do gel que ficava apenas onde havia proteínas, permitindo assim a visualização das proteínas em forma de bandas.

3.15.2 Coloração com nitrato de prata

Quando necessitava de uma coloração mais sensível, foi realizada a coloração com nitrato de prata. Após fixação durante 1 hora em solução de fixação de SDS-PAGE, o gel foi lavado 2 vezes em 30% etanol por 20 minutos, e 2 vezes em H₂O por 20 minutos. O gel foi sensibilizado em solução de sensibilização para coloração por prata durante 1 min, lavado 3 vezes em H₂O durante 20 segundos, incubado em solução de coloração por prata durante 20 min a 4°C e lavado em H₂O durante 1 min. A revelação ocorreu em solução de revelação de prata e, após lavagem durante 20 segundos em H₂O, a reação de revelação foi interrompida com solução de término de revelação de prata. O gel foi lavado 3 vezes em H₂O durante 10 minutos e armazenado a 4°C em 1% ácido acético.

3.15.3 Transferência para membrana de nitrocelulose e realização de *western blot*

Ao final da corrida eletroforética, foi montado o sistema de transferência para *western blot*, onde um pedaço de membrana foi colocado sobre o gel de poli(acrilamida), ambos protegidos por um pedaço de papel 3 MM que, por sua vez, foi protegido por um pedaço de esponja apropriada. O sistema foi colocado em cuba de transferência e submerso em tampão de transferência 1x, foi aplicada corrente elétrica sob voltagem de 20 volts durante 18 horas de 100 Volts por 1 hora.

Ao final da transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada por 5 minutos em *Ponceau S* para coloração reversível das proteínas. A membrana foi lavada em água para eliminação do excesso do corante e as canaletas foram identificadas e demarcadas ou recortadas, dependendo do caso. A canaleta do marcador de peso molecular foi recortada e as bandas foram identificadas para posterior comparação com o resultado obtido nas demais canaletas.

A membrana foi incubada por 1 hora na solução de bloqueio 5% sob agitação a temperatura ambiente, ou por 18 horas sem agitação na geladeira, quando foi então lavada três vezes por 5 minutos no tampão PBS-*Tween* 0,05%, seguida da incubação na solução contendo o anticorpo primário durante 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Quando o objetivo foi a verificação da expressão heteróloga, o anticorpo primário utilizado foi o anticorpo comercial anti-histidina diluído 3000 vezes no tampão PBS-*Tween* 0,05%. Quando o objetivo foi a verificação da presença de anticorpos presente no soro dos camundongos, foi utilizado o soro dos camundongos diluído 250 vezes no tampão PBS-*Tween* 0,05%. Terminado o tempo de incubação, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos no tampão PBS-*Tween* 0,05% e foi incubada no anticorpo secundário comercial anti-*mouse* (para camundongo) ou anti-*rabbit* (para coelho) conjugados à AP diluído 10000 vezes no tampão PBS-*Tween* 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada por três vezes com o tampão PBS-*Tween* 0,1% e colocada para revelar no tampão de revelação, que consistiu de 10 mL AP *Buffer* adicionado de 33 µl BCIP e 66 µl NBT, no escuro por até 5 minutos. Para parar a reação de revelação, a membrana foi colocada em uma solução de 10 mM EDTA.

3.16 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Quando foi detectada a expressão da proteína, foi preparado um gel de poliacrilamida com volume de 50 mL em uma cuba de eletroforese própria. Foram aplicados 3 mL da solução de proteína com 1 mL de tampão de amostra 4x. O gel foi submerso em tampão de eletroforese SDS-PAGE e depois de aproximadamente 15 horas sob amperagem de 30 mA, o gel foi retirado e colocado em solução de 0,1 M KCl gelado. Com um estilete, a banda mais espessa foi cortada do gel, pois era a que representava a proteína expressa. Esse pedaço de gel foi colocado em uma membrana de diálise, juntamente com aproximadamente 1 mL de tampão de corrida SDS-PAGE para remover a proteína do gel.

A membrana de diálise foi colocada em uma cuba de eletroforese horizontal, em sentido transversal, com tampão de corrida SDS-PAGE e ficou sob voltagem 60 V por 2 horas. Os pólos da cuba foram invertidos, permanecendo por mais 2 minutos

sob voltagem 60 V. Dentro da membrana de diálise, estavam as proteínas em solução, que foi retirada da membrana de diálise e armazenada. Este procedimento foi repetido de duas a três vezes, com o mesmo pedaço de gel.

3.16.1 Quantificação da proteína purificada

Para a quantificação das proteínas purificadas, foi utilizado o Qubit™ Fluorometer (Invitrogen), conforme orientações do fabricante. A plataforma de quantificação do Qubit utiliza corantes fluorescentes específicos para DNA, RNA ou proteínas, evitando a contaminação por outras macromoléculas.

3.17 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS EM CAMUNDONGOS

A utilização dos camundongos para este projeto e o protocolo institucional foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Fiocruz (CEUA), licença de número L005/09 (anexo). Foram utilizados camundongos linhagem *Swiss* com mais de 40 dias de vida.

3.17.1 Avaliação dos anticorpos presentes no soro pré-imune

Esta avaliação consiste na verificação da presença de anticorpos no soro dos camundongos antes da imunização que possam estar reconhecendo algum epítipo de alguma proteína de *T. cruzi* através de uma reação inespecífica. Foi retirado aproximadamente 100 µL de sangue da cauda dos camundongos antes das imunizações – pré-imuno. O sangue foi incubado a 37°C por 45 minutos e centrifugado por 10 minutos a 16.000 x g para a obtenção do soro.

Em um gel de poliacrilamida, foi aplicado extrato de proteínas do *T. cruzi* proveniente de 10⁷ células, e após a corrida eletroforética, foi realizado *western blot*

como descrito no item 3.15.3. Quando houve reconhecimento de alguma proteína, o camundongo não foi utilizado, caso contrário, o camundongo foi utilizado para as inoculações, sendo que foram utilizados dois camundongos para cada proteína.

3.17.2 Inoculações das proteínas purificadas em camundongos

Para a primeira inoculação em cada camundongo, foi preparada uma solução com 40 µg da proteína purificada, 200 µL de adjuvante completo de Freund e solução salina 0,9% para volume final de 400 µL, quantidade suficiente para inoculação em dois camundongos. As injeções foram feitas na região intra-peritoneal dos camundongos e foram repetidas a cada 14 dias. Para as segunda, terceira e quarta injeções, foram preparados 40 µg da proteína purificada, 77 µL de hidróxido de alumínio (Alu-Gel-S) e quantidade suficiente de solução salina 0,9% para 400 µL, quantidade suficiente para os dois camundongos.

Sete dias após a quarta inoculação, foi retirado aproximadamente 250 µL de sangue da cauda dos camundongos para verificar se houve produção de anticorpos contra a proteína inoculada. Quando a quantidade de anticorpos produzidos era pequena, as inoculações eram repetidas da mesma forma e no mesmo intervalo de tempo.

3.17.3 Verificação da produção de anticorpos contra a proteína recombinante e contra o extrato proteico de *T. cruzi*

Em um gel de poliacrilamida, foi aplicado extrato de proteínas do *T. cruzi* proveniente de 10^7 células e 0,5 µg da proteína recombinante purificada, e após a corrida eletroforética, foi realizado *western blot* utilizando o soro dos camundongos (aqui chamado de antissoro – soro com anticorpos), como descrito no item 3.17.1.

Para a obtenção de maior quantidade de soro, os animais foram sedados e anestesiados com uma solução contendo 1 mg/mL quetamina e 0,1 mg/mL xilazina (0,1 mL/10 g) e o sangue obtido por punção cardíaca.

3.17.4 Ensaio de *western blot* competitivo

A fim de certificar se as bandas que apareceram no *western blot* do soro contra o extrato de *T. cruzi*, foi realizado um novo *western blot* com competição da proteína recombinante purificada e de proteínas solúveis de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Durante a incubação com o antissoro foi adicionado 50 µg/mL da proteína recombinante purificada e 20 µL de extrato proteico solúvel de *E. coli*, assim, os anticorpos produzidos contra a proteína recombinante e contra proteínas de *E. coli* se ligariam às proteínas em solução e não às proteínas do extrato de *T. cruzi* imobilizadas na membrana de nitrocelulose.

O resultado esperado era o não aparecimento de bandas após a revelação do *western blot* e, quando foi isso que aconteceu, concluímos que os anticorpos que estavam se ligando ao extrato proteico de *T. cruzi* foram de fato produzidos pela proteína recombinante e eram específicos para a proteína em estudo.

3.17.5 Purificação dos anticorpos

Foi realizado um SDS-PAGE com 80 µg da proteína recombinante purificada que foi transferida para membrana de nitrocelulose. A porção da membrana contendo a proteína foi recortada e incubada em uma solução contendo 250 µl do soro diluído em 800 µl PBS-*Tween* 0,05% e 20 µl de proteínas solúveis de *E. coli* durante 2 horas. A membrana foi então lavada duas vezes durante 5 minutos em PBS-*Tween* 0,05% e transferida para 500 µl de 0,2 M glicina pH 2,5 para eluição dos anticorpos. Após 2 minutos de incubação, a solução de glicina foi retirada e transferida para 50 µl de 1 M Tris-HCl pH 9,5, a fim de neutralizar a solução e foi adicionado 10 µl 1 mg/mL BSA.

3.18 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para adesão dos parasitas na lâmina, foi adicionado 20 µl de poli-L-lisina que ficou durante 20 minutos a 37°C. Após esse tempo, a lâmina foi lavada e seca.

Os parasitas foram centrifugados a 7.000 rpm por 3 minutos e lavados duas vezes com PBS 1x centrifugados a 7.000 rpm por 1 minuto. As células foram ressuspensas no volume de PBS 1x suficiente para que a densidade ficasse em 10⁸ células/mL.

Em cada poço com poli-L-lisina, foi adicionado 20 µl da suspensão celular e 20 µl de paraformaldeído 4%. Após 5 minutos, cada poço foi lavado com aproximadamente 20 µl de PBS 1x por duas vezes. Para a lise celular, foi adicionado 20 µl de 0,05% Triton x-100 diluído em PBS 1x e, após 2 minutos, esta solução foi retirada dos poços que foram lavados com PBS 1x por quatro vezes. O bloqueio foi realizado com 20 µl de 1% BSA diluído em PBS 1x durante 1 hora a 28°C ou durante 16 horas a 4°C.

A solução de bloqueio foi removida e foi adicionado 20 µl do antissoro diluído em solução de bloqueio. Para cada soro foram realizadas diferentes diluições: inicialmente entre 1:50 a 1:300. Como controle, foi realizada incubação também com o soro pré-imune do mesmo camundongo. A incubação ocorreu durante 1 hora em câmara úmida a 37°C. A solução foi removida e a lâmina foi lavada por imersão em PBS 1x durante 5 minutos sob lenta agitação por três vezes. Foi adicionado 20 µl do anticorpo secundário – α -mouse conjugado a Alexa 488 diluído 1:500 em solução de bloqueio – e a incubação novamente ocorreu durante 1 hora em câmara úmida a 37°C no escuro. A lâmina foi lavada por imersão em PBS 1x durante 5 minutos sob lenta agitação, no escuro, por duas vezes. Foi adicionado 20 µl de 1 µg/mL DAPI diluído em PBS 1x e, após 5 minutos, a lâmina foi novamente lavada por imersão em PBS 1x durante 5 minutos sob lenta agitação, no escuro, por seis vezes. O excesso de PBS 1x foi removido, foi adicionado 10 µl de N-propil-galacto e foi colocada a lamínula própria, que foi selada com esmalte. As lâminas foram visualizadas em microscópio Nikon, as imagens foram capturadas usando a câmara CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

3.19 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

Para a realização dos ensaios de imunoprecipitação, dois tipos de extratos foram preparados: um extrato obtido com tampão de lise não desnaturante, que mantém as propriedades nativas das proteínas, inclusive os complexos de interação proteína-proteína; e outro obtido com tampão de lise desnaturante que, como o próprio nome sugere, promove desnaturação das proteínas, desfazendo as interações proteicas. O extrato obtido com tampão de lise desnaturante foi utilizado quando se desejava identificar determinada proteína que estava sendo reconhecida pelo antissoro, e o extrato obtido com tampão de lise não desnaturante foi utilizado quando se desejava a obtenção de complexos proteicos para identificação de proteínas que estivessem interagindo com a proteína de interesse.

Aproximadamente 200 µl de proteína A ou G sepharose (A para anticorpos de coelho e G para anticorpos de camundongos) foi hidratada com 1 mL de solução hidratante durante 1 hora. A resina foi então centrifugada 600 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e, ao volume restante de resina foi adicionado o mesmo volume de solução hidratante.

A solução contendo a resina proteína A ou G sepharose foi homogenizada e foi utilizado 100 µl para cada reação. Este volume foi centrifugado 1.000 x g durante 1 minuto e o sobrenadante foi descartado. A resina foi lavada uma vez com 100 µl de H₂O e outra com 100 µl de PBS 1x, sendo submetida à centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. Entre 15 e 30 µl de antissoro foi diluído em tampão de diluição para imunoprecipitação, em volume final de 200 µl, e foi incubado com a resina durante 2 horas sob agitação. O volume do antissoro variou dependendo do resultado observado em *western blot*. A resina foi submetida à centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e foi lavada três vezes: uma com 200 µl tampão de diluição para imunoprecipitação, outra com 200 µl de PBS 1x e a última com 200 µl de tampão de lavagem para imunoprecipitação, sendo submetida à centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. Para ocorrer o *crosslinking* dos anticorpos na resina, foi adicionado 200 µl de tampão de *crosslinking* para imunoprecipitação e, após 30 min de incubação sob agitação, a resina foi centrifugada nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e a resina foi lavada com 200 µl de tampão de lavagem

para imunoprecipitação, centrifugada nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. Este processo de *crosslinking* e lavagem foram repetidos por mais duas vezes. Para parar a reação, foi adicionado 200 µl de tampão de parada do *crosslinking* e, após 5 min de incubação, foi centrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. Este processo de parada da reação foi repetido mais duas vezes. Para remover o excesso de anticorpos que não foram ligados, foi adicionado 200 µl de 0,2 M glicina pH 2,5 e, após 4 min, foi centrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. A resina foi ressuspensa em 1 mL de PBS 1x, foi adicionado 10 µl de 1 M Tris pH 8,0, foi centrifugada nas mesmas condições. Este processo de lavagem em PBS 1x foi repetido por mais três vezes e a resina foi incubada com 1 mg do extrato de proteínas durante 16 horas a 4°C.

Quando foi utilizado o extrato obtido a partir do tampão de lise desnaturante, este foi diluído 4 vezes em tampão de lise não desnaturante, para que o β-mercaptoetanol e o SDS, presentes no tampão de lise desnaturante, não atrapalhem o processo de ligação das proteínas aos anticorpos. Para comparação com o extrato de proteínas não ligado, após a incubação, foi armazenado 100 µl do extrato diluído.

Após a incubação, a resina foi submetida à centrifugação 1.000 x g por 1 min, o sobrenadante foi armazenado para controle das proteínas não ligadas e a resina foi ressuspensa em 500 µl de tampão de lise não desnaturante. Após 5 min de incubação, foi submetida à centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Este processo de lavagem com tampão de lise foi repetido por quatro vezes, sendo que nas duas primeiras a concentração foi de 150 mM NaCl, e as demais foram com 300 mM NaCl. A eluição das proteínas ligadas ocorreu com 50 µl de 0,2 M glicina pH 2,5 durante 5 minutos e foi centrifugada 6.000 x g por 5 min. O eluído foi armazenado com 5 µl de 1 M Tris pH 9,5.

3.20 GERAÇÃO DE *T. cruzi* MUTANTES EXPRESSANDO MIOSINAS FUSIONADAS ÀS ETIQUETAS DE GFP, MYC E PTP

Plasmídeos obtidos a partir da recombinação para os vetores pTcGFPN, pTcMYCN e pTcPTP, descrito em 3.11.2 foram utilizados para transfectar *T. cruzi*.

Aproximadamente 4×10^7 células de parasitas foram centrifugadas 5

minutos a 4.000 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL PBS 1x estéril, e foi centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 400 µL de tampão de eletroporação, o volume foi transferido para cubeta de eletroporação estéril e foi adicionado 15 µg da solução de plasmídeo purificado. As células foram eletroporadas em dois pulsos de 450 V e 500 µF, permaneceram por 10 minutos no gelo e foram transferidas para 10 mL de meio LIT, e incubadas na estufa a 28°C.

Vinte e quatro horas após a transfecção foi adicionado o antibiótico G418 para concentração final de 250 µg/mL, e a cultura permaneceu na estufa a 28°C por mais 72 horas, quando foi realizado um repique para densidade 1×10^6 células/mL, com 500 µg/mL G418. A cultura foi mantida a 28°C e monitorada de forma que a densidade ficasse em torno de 1×10^6 células/mL.

Depois que ocorreu a seleção dos parasitas resistentes à droga, as culturas passaram por três ciclos de crescimento de três dias e os transfectados com os vetores pTcGFPN foram fixados em lâmina para visualização da fluorescência; os transfectados com o vetor pTcMYCN foram fixados em lâmina para imunofluorescência com anticorpos anti-c-myc; e os transfectados com o vetor pTcPTP foram imunoprecipitados com anticorpos anti-proteína C.

3.20.1 Preparo de lâminas contendo parasitas expressando miosinas fusionadas à etiqueta de GFP

Para que os parasitas fossem aderidos na lamínula, 20 µL de 0,1% poli-L-lisina foi colocado no centro de cada lamínula, que permaneceram por 20 minutos a 37°C, foram lavadas e colocadas para secar.

Foram centrifugados 500 µL de cultura por 3 minutos a 4.000 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1x e centrifugadas nas mesmas condições por duas vezes. As células foram então ressuspensas em um volume de PBS 1x de forma que em 20 µL da solução tivesse 1×10^6 células.

As lamínulas foram colocadas em poços de placa de cultura contendo a poli-L-lisina na face de cima e 20 µL da solução dos parasitas foi colocado sobre a poli-L-

lisina e aguardado 5 minutos. Foram adicionados 20 μ L de 4% paraformaldeído e, 5 minutos depois, 20 μ L dessa solução foi retirada e foi colocado 20 μ L de 4 μ g/mL DAPI + 0,2% Triton. Após 5 minutos, foi adicionado 1 mL de PBS 1x e, após 1 minuto sob agitação, a solução foi descartada e esse procedimento foi repetido por mais 3 vezes.

Em lâmina de microscopia, foi colocado 5 μ L de N-propil-galacto, a lamínula foi colocada virada para baixo sobre essa gota e foi selada com esmalte. A lâmina foi visualizada em microscópio Nikon, as imagens foram capturadas usando a câmara CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v. 4.5.1.22 (Media Cybernetics).

Este procedimento foi realizado para o vetor pTcGFPN contendo tanto as CDS inteiras como os fragmentos cauda. As transfecções geradas a partir dos vetores com as CDS completas foram utilizadas para verificar a localização celular, enquanto as transfecções geradas a partir do vetor com a cauda foi utilizada para verificar a localização apenas deste fragmento de proteína na célula e para observar se haveriam alterações fenotípicas, causadas pela presença de um dominante negativo, pois o fragmento da proteína poderia interferir com a função da proteína normal na mesma célula.

3.20.2 Imunofluorescência de parasitas transfectados com o vetor pTcMYCN

O processo de imunofluorescência ocorreu da mesma forma como descrito em 3.18, utilizando anticorpos anti-c-myc para marcação da proteína fusionada à etiqueta c-myc. Esta lâmina foi visualizada em microscópio O material foi observado em microscópio confocal LEICA SP5.

3.20.3 Imunoprecipitação de parasitas transfectados com o vetor pTcPTP

Foram preparadas duas cultura de 150 mL com 10^6 células/mL, uma com parasitas selvagem e outra com parasitas transfectados com o vetor pTcPTP. Após

quatro dias de crescimento, o volume total foi centrifugado por 5 min a 6.000 rpm, 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 30 mL de PBS 1x gelado. Este processo de lavagem com PBS 1x foi realizado duas vezes. O sedimento foi então ressuspenso em 1 mL de tampão de lise hipotônica (com 0,5% NP-40) com tablete de coquetel de inibidor de proteases, e a lise dos parasitas foi monitorada em microscópio invertido. Após aproximadamente 5 minutos, a solução foi diluído em mais 4 mL do mesmo tampão com 0,1% NP-40, e foi centrifugado por 10 min a 10.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi transferido para uma coluna de purificação gelada e foi adicionado 50 µl de resina contendo o anticorpo anti-proteína C. Após 2 horas de incubação a 4°C, o extrato não ligado foi recuperado, e foi adicionado 1 mL do tampão de lise hipotônica sem inibidor, para recuperação da resina, que foi então transferida para um tubo de 1,5 mL. Após 5 minutos de incubação a 0°C, foi submetido à centrifugação a 12.000 x g por 30 segundos, e o sobrenadante descartado. Este processo de lavagem com tampão de lise hipotônica foi repetido por mais duas vezes e o sobrenadante foi armazenado. Foi adicionado 200 µl de tampão de eluição e, após 5 minutos a 0°C, foi submetido à centrifugação a 12.000 x g por 30 segundos e o sobrenadante foi armazenado. Este processo de eluição foi repetido mais uma vez.

As resinas foram restauradas para reutilização em novo ensaio. Para a restauração, foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem, foi submetido à centrifugação a 12.000 x g por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. A resina foi então ressuspensa em 1 mL de tampão de equilíbrio, foi submetido à centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. Este processo de equilíbrio foi repetido por mais duas vezes, e a resina foi armazenada com 1 mL de tampão de equilíbrio adicionado azida sódica 0,09%.

3.20.3.1 Precipitação proteica com acetato de amônio

As segunda e terceira frações de lavagem após a incubação do extrato com a resina e a fração eluída foram precipitadas com acetato de amônio para diminuir o volume de solução de proteínas, para que pudesse ser aplicado em gel de poliacrilamida para eletroforese em SDS-PAGE.

Foi adicionado 10 M acetato de amônio para concentração final de 2,5 M e, após 30 min de incubação sob agitação, foi submetido à centrifugação por 10 min 15.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 1 mL de metanol gelado por aproximadamente 30 segundos no vórtex e então submetido à centrifugação nas mesmas condições. O processo de lavagem com metanol foi repetida por mais duas vezes, o sobrenadante foi descartado e o sedimento permaneceu a 55°C. Após a evaporação do metanol, foi adicionado 3 µl de H₂O, 12 µl de 9,5 M ureia e 5 µl de TA 4x.

3.21 NOCAUTE GÊNICO EM *T. cruzi*

O *T. cruzi* não realiza interferência por RNA, portanto, para eliminar a proteína dos parasitas, foi realizado nocaute gênico por recombinação homóloga. Sendo assim, foi construído um cassete para transfecção de *T. cruzi* que continha as duas regiões intergênicas do gene (*UP* – intergênica a 5' – e *DOWN* – intergênica a 3') flanqueando um cassete que continha o gene de resistência à neomicina ou à higromicina flanqueados pela região intergênica entre os genes da enolase e da KAP3 de *T. cruzi* na extremidade 5', e a região intergênica entre cópias do gene GAPDH de *T. cruzi* na extremidade 3'. As regiões *UP* e *DOWN*, assim como os cassetes contendo os genes de resistência a neomicina e a higromicina foram amplificados por PCR. As regiões intergênicas foram amplificadas a partir do DNA genômico de *T. cruzi* e os cassetes foram amplificados a partir dos vetores pNeo2 e pHig2 (FIGURA 18).

Como a regulação da expressão gênica ocorre nas regiões UTR do mRNA, as regiões intergênicas entre os genes da enolase e KAP3, e entre cópias do gene GAPDH têm a função de garantir que o mRNA dos genes de resistência aos antibióticos sejam expressos, regulando-o positivamente.

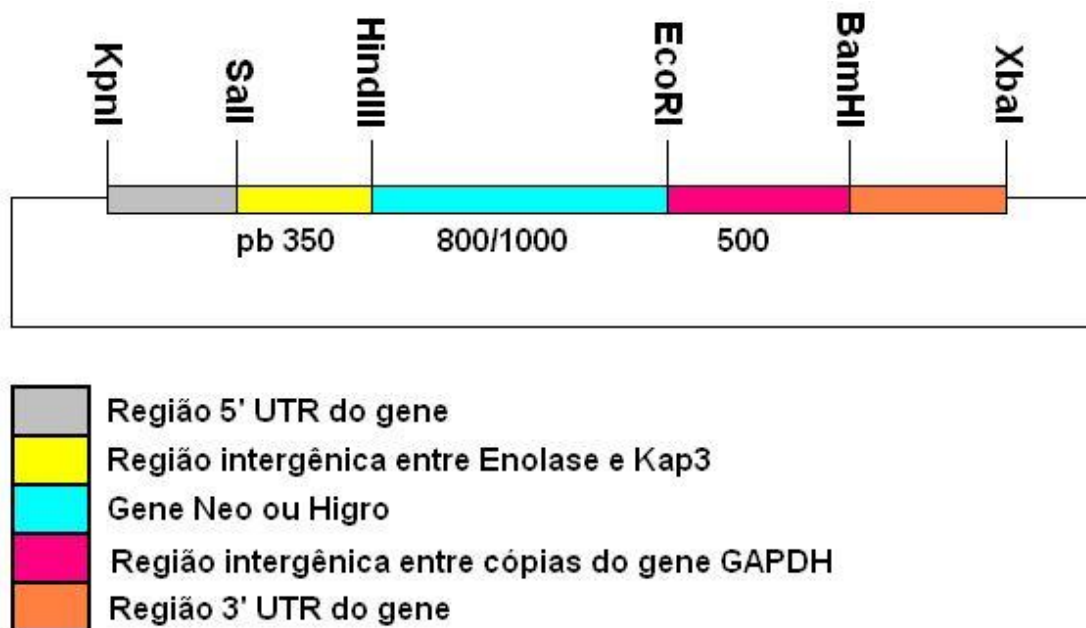


FIGURA 18 - ESQUEMA DOS VETORES pNEO2 E pHIG2

FONTE: DE SOUZA, dados não publicados

NOTA: Na figura estão indicadas as enzimas para sítios de restrição. As cores de cada segmento estão indicadas na legenda. pb 350, 800/1000, 500: o tamanho de cada segmento correspondete em pares de bases.

Para a construção do cassete utilizado para transfectar os parasitas, foi realizada uma PCR de fusão para obter um produto que consistiu das regiões *UP* + cassete + *DOWN*. A PCR de fusão foi realizada com a adição dos três produtos de PCR, utilizando os oligonucleotídeos *forward* da região intergênica a 5' e *reverse* da região intergênica a 3'. Para a PCR de fusão, várias condições foram testadas, e estão descritas no item de resultados.

A transfecção ocorreu da mesma forma como descrito em 3.19.

3.22 INTERFERÊNCIA POR RNAi EM *T. brucei*

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados contendo os sítios das enzimas de restrição *Bam*HI (F) e *Hind*III (R) para clonagem no vetor p2T7-177 (FIGURA 19). No entanto, no instituto este vetor foi modificado pela digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Cla*I para liberação do fragmento de GFP e inserção do gene para *LacZ* flanqueado por sítios de restrição para a enzima *Xcm*I. A digestão com a enzima *Xcm*I proporciona uma extremidade contendo o nucleotídeo

adenina para clonagem por ligação T-A com a enzima T4 DNA ligase. O esquema do vetor modificado está mostrado na figura 20.

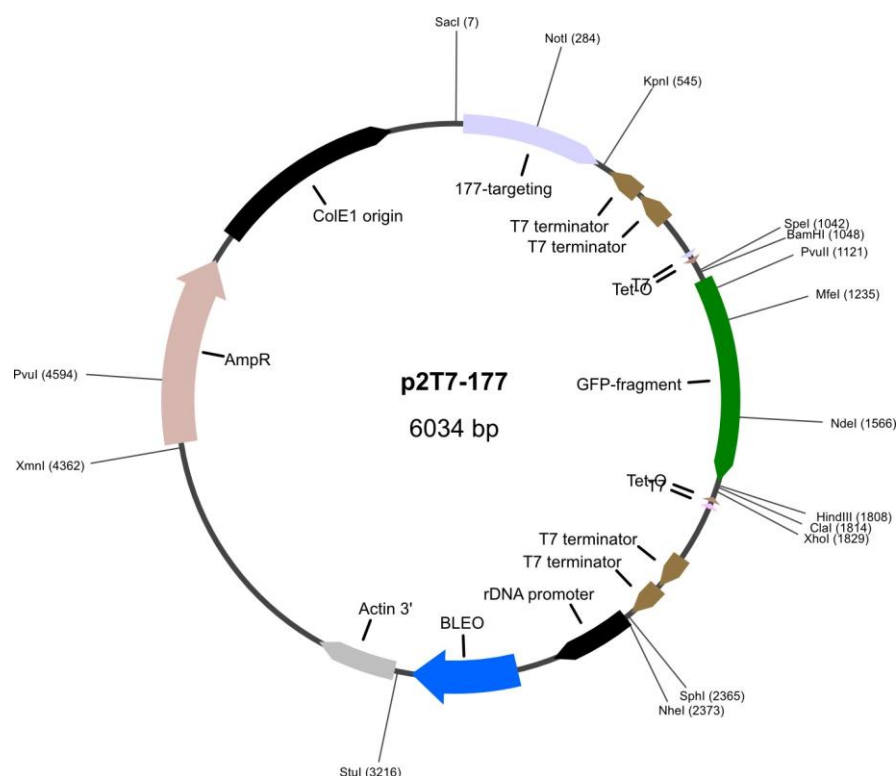


FIGURA 19 – MAPA DO VETOR p2T7-177

FONTE: WICKSTEAD (2002)

NOTA: A Região onde está o fragmento de GFP (*GFP-fragment*) será substituída pelo fragmento do gene amplificado que será induzido por tetraciclina no sítio Tet.

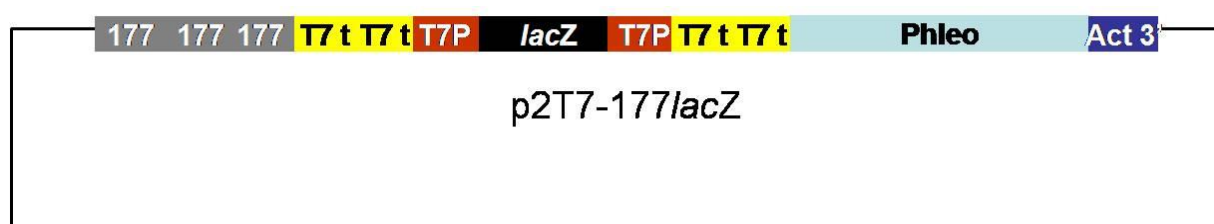


FIGURA 20 – ESQUEMA DO VETOR p2T7-177lacZ

FONTE: BATISTA, dados não publicados

As regiões dos genes *myo1* e *myo13* de *T. brucei* foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores específicos a partir do DNA genômico utilizando a enzima *Platinum® Taq* DNA polimerase *High Fidelity*.

Quantidade suficiente de vetor p2T7-177lacZ para 50 ng por reação e mais 100 ng foi digerido com a enzima *XcmI* por 2 horas a 37°C. A enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos. Quantidade suficiente para 100 ng do vetor digerido foi aplicado em gel de agarose e submetido à corrida eletroforética para verificação de ter ocorrido a digestão com liberação do fragmento *lacZ*.

O vetor possui 5200 pares de bases e, portanto, 50 ng correspondem a 14,5 fmoles. Para a reação de ligação, foi utilizado 145 fmoles do produto de PCR purificado, que corresponde a aproximadamente 47,85 ng de um produto de 500 pares de base. A ligação ocorreu com a enzima T4 DNA ligase a 14°C por 16 horas e a reação de ligação foi inserida em células DH5- α cálcio-competentes. As células foram plaqueadas em meio seletivo contendo LB + 100 μ g/mL ampicilina + IPTG X-GAL, assim, as células que receberam o vetor contendo o gene para o *lacZ* deveriam ficar azuis enquanto as células que receberam o vetor contendo o inserto deveriam ficar brancas.

A seleção das colônias positivas ocorreu pela técnica de *toothpick* e PCR após a purificação plasmidial. O vetor p2T7-177*lacZ* purificado contendo os insertos de interesse foi digerido com a enzima *NotI*-HF para linearização do vetor. Para cada vetor, foram digeridos 10 μ g de DNA. A digestão ocorreu com 5 unidades da enzima *NotI*-HF para 5 μ g de vetor por 16 horas a 37°C e a enzima foi inativada a 65°C por 20 minutos. O vetor digerido foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose para verificação da linearização e, quando positivo, foi inserido em parasitas *T. brucei* por transfecção.

Para cada transfecção, foi utilizado 4×10^7 parasitas com 2 a 3 dias de cultivo. Os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 6.000 x g a 10°C e ressuspensos no mesmo volume de solução ZPFM e centrifugados nas mesmas condições. As células foram ressuspensas no volume necessário de ZPFM para que a densidade ficasse em 8×10^7 células/mL e 500 μ l dessa solução celular foi utilizada para cada transfecção. As transfecções ocorreram em cubetas de 0,4 mm com 10 μ g do vetor linearizado e foi realizada uma transfecção sem DNA para utilizar como controle. Foram realizados 2 pulsos de 25 μ F e 1,6 kV e as células foram transferidas para 10 mL de meio SDM-79 suplementado com 10% soro fetal bovino, 50 μ g/mL higromicina e 15 μ g/mL G418. Vinte e quatro horas após a transfecção, foi adicionado 5 μ g/mL do antibiótico fleomicina para seleção dos parasitas transfectados.

Os parasitas foram monitorados para que a densidade ficasse em torno de 1×10^6 células/mL.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO E ANÁLISE DOS GENES

Os genes para as miosinas de classes I e XIII foram obtidos a partir do banco de dados GeneDB. O gene para a *myo1* (TcCLB.507739.110) está identificado como cadeia pesada da miosina IB, putativo. No entanto, o gene para a *myo 13*, assim como para as outras miosinas de *T. cruzi*, está identificado apenas como cadeia pesada de miosina, putativo. O gene da *myo13* (TcCLB.511527.70) foi, portanto, localizado através da ortologia com outros tripanossomatídeos, visto que as demais miosinas são exclusivas de *T. cruzi* e não possuem ortólogos.

De acordo com uma busca de domínios no banco de dados Pfam, a *myo 1* possui, além do domínio da cabeça de miosina, característico desta família de proteínas, o domínio TH1 truncado pela inserção do domínio dedo de zinco FYVE e o domínio WW de interação proteica (FIGURA 21). O domínio TH1 (*tail homology 1*) é o domínio de homologia da cauda da miosina 1, rico em resíduos básicos e parece estar envolvido com interações de membrana através da associação com fosfolípídeos ácidos. Nas miosinas de classe I tripanossomatídeos, o domínio TH1 é interrompido pela presença do domínio FYVE, que também tem potencial de se ligar às membranas, via interação com fosfatidilinositol-3-fosfato. Além desses, a *myo1* de tripanossomatídeos possui o domínio WW, associado com interações proteína-proteína, e não encontrados normalmente em miosinas de classe I (SPITZNAGEL, 2010).

A busca de domínios no banco de dados Pfam para a *myo13* mostrou que, além do domínio da cabeça de miosina, esta proteína possui, na porção C-terminal, dois domínios UBA associados à ubiquitina adjacentes (FIGURA 22), ainda não se sabe a função que este domínio tem para esta miosina.

As figuras 23 e 24 mostram o alinhamento feito entre as *myo13* de *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. vivax* e *L. major*, e o alinhamento feito entre as *myo1* de *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. vivax*, *L. major*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. O alinhamento feito com a *myo13* (FIGURA 23) mostra o alinhamento inteiro, enquanto

que o alinhamento feito com a myo1 mostra apenas a região da cabeça, que é onde se encontra a maior similaridade entre elas (FIGURA 24). Para cada organismo, foi selecionada a sequência de miosina que obteve maior semelhança com a sequência de *T. cruzi*. O alinhamento foi realizado utilizando o software ClustalW2 (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) com os parâmetros padrão e o resultado foi mostrado usando o software JALVIEW (disponível em <http://www.jalview.org/download.html>) usando o esquema de cores BLOSUM62 Score, com valor de visibilidade de conservação 30. A semelhança observada entre as duas miosinas de *T. cruzi* com as miosinas destes outros organismos está resumida na tabela 5. Assim, observamos que, mesmo entre os tripanossomatídeos do mesmo gênero *Trypanosoma*, a semelhança entre elas é baixa, ao contrário do que ocorre com as diferentes espécies de *Leishmania*, cuja identidade varia entre 86 a 99% (KATTA *et al.*, 2009).

```
MACVDFKKS AVVGVEDLVLLPQLSDKAIMENLKL RHSKDIIYTSIGPVLLSVNPFKKIPNLYGEER
IAFFRSGGKSSGGTGFITHGGPHIFGLAEETYRTMVSEENQCVIISGESGAGKTEASKQIMQYI
SAVSGNTVEMQHV KRVILESNLLEAFGNAKTVRNDNSSRFGKFFEIFFRMGGPVGGGRMSN
FLEKSRVVSQQLGERSFHVYQFCHGASPTLRERLRLRPPGEFFYLNQGGTLDRDGVDDAKE
WAETLAAMEAMSISMSDQQSIFDTLALILHLGQLQFAPSAADREDAALMVSNPEELNFCAML
LGVDAAVLEWAFTWKRLMG TSEVVNVPLDIQQCRNARDALAKTLYHHLFDFVVESVNVAL
GKKPYDLM LGVLDIYGFEIFEKNGFEQFCINYNVEKLQQIFIELTLKVEQEEYVREKIPWEEIKYF
NNKIVCELIEGTQPPGLFSVMDDVCATMAKEKESVADIKMLDKLDAVHTGNPHFNRTERGFR
IKHYAGDVYNAEGFTTRNKDLLGADIALVLGTSSNQFLKILAETIAGAAQGRVTGKKPRVTTA
GFKMRQQASYLVKTLMG CNPHYVRTIKSNDEKRRDFLDEARVLHQVKYLG LLENIRVRRAGYS
YRQYFDKFLKRFKYVSETFPRSFKGSDRDACAAILRHVGDALPQGSWQLGQQKVFI RQPQHL
FTLEDLRENALDNIVFKIQRAWRRYQQNKDSVLMKSAIGRMYLKAGKTRRADSVFRPFFGDYL
DYNRLKPLHPYVEFNPIGSAWKEFWTEAGKRYHNAIFQQSQWERPREMSPQKIVFTALVE
RVVNHQKALLEKNFLITDLAVYMIQERLETIVQPAKPTKKNAHPLPPSNSTITRYLLQKRLDLR
LLSGISLTTHADTVLLLHFYQPTVPYRPIVGNTTAKSSKKVYHCECCGGKLLPAATKQNCPCGR
LCCA KCLQYNRPLPTLLGH SKPVRVCPNCVHGE PFEPVEDVVLMT PMKTEVVAVLRKLYRQL
MGNKVPVTISDGLTYHLFG ENRPWILTATALPSISETALISSCPFTLAVSAPPGISQEIIQAIETAR
EKRRGAAAERRRKEEEEEERARELLREREREEEHRRVVEERKTARA AVEQKQESERLQREQAAR
DQREESARIVAERSTWYR
```

FIGURA 21 – ESTRUTURA PRIMÁRIA DA MYO1 DE *T. cruzi* COM SEUS DOMÍNIOS RELEVANTES
 LEGENDA: Vermelho: domínio cabeça de miosina (PF00063); Amarelo: domínio TH1 (PF06017);
 Azul: domínio FYVE (PF01363); sublinhado: domínio WW (PF00397)

MNEPAIERVAVQQQVYYLPPQKGWLRGVVATVLDGEKKAHVNNATTGNKETVPLSQIHGYMDQAFDPSDPDLFHLSDLHVATTLYCIKERFVQLKQQYSIMGEMLISVNPFRMPFNSDA
 YMDQAFDPSDPDLFHLSDLHVATTLYCIKERFVQLKQQYSIMGEMLISVNPFRMPFNSDA
 HREKYLNSAQNHLLPPHIWQVAHRAYSQIVIRGFDNQSVVISGESGSGKTENTKMLIYYL
 GELSHMHSSNAMQKSVADKVANCLKWSNPLESFGNARTVRNDNSSRFKGYIKLYFDP
 SGVMVGGQTVTYLLEKSRILLQSVGERNYHIFYEMLAGLSPEEKELGDLKSAQEYKCLSG
 GNTFVRRGVGDKTLDDSLFQNVLHALTALDVEADVQRSIFKVLASILHLELRFKSDQND
 MACFEDEAPFLTACSLQLDPALLRECFLVKSHTSLVTIYANKTEAEGFCGAFCKAIYVGLF
 DRLVDFVNQSIDAHGEVSRCKYIGLLDIFGFEKFTRNSEQLCINYANEALQNHYNKYTFL
 NDEAECEAEIEVPKIVFPDNSECVQMLDQKKIGVFSMLDEECHFKGGTVERFTHNLWDQ
 WANKSKYFVLPKSTVPNQFGVNHYAFAVNYNTDEWLEKNTDRVKEEAYQCILNSGDPFIR
 TLTPKDSLLDKRKQTVARLFEQQLAALREELESTETQFIRCIPKNMEASPDTLNCLVGNQ
 LESAGVLQTIALKRQGYPMRRTIEQFCRYFFLIMPRSAIRLFKQNKLKAAAKDFLAYYQKLY
 GWQKPHYAVGHTKVFVRAEVWSSVERLLRLRRKAWLLRRCVPFLLRWVYTNREQRLAE
 RRKEELRKAKEERERLIAEINARGFSLEQMEWVEELATLFSSVDVSTLIDIVAILPKREESLA
 TLTEMQQQRVDGSLPSTFMRVMSESEVRPSVVQALVEGGVATMAGLSQCDQAQMKQFG
 MTDAEVAAVTRTILKEQSARVKLERLQSSIGTAQLEKVVGEVKRRVMTQSDFA TKVEKLV
 RMGFPRSHAELTLTHYNGDVQKAAERL LHGGVEKHLHEEPHGSKGRWTSLDPE VQRLV
 KLGVPKGAARKVLRQTSGNVDEAVRLVFPVPS

FIGURA 22 – ESTRUTURA PRIMÁRIA DA MYO13 DE *T. cruzi* COM SEUS DOMÍNIOS RELEVANTES

LEGENDA: Vermelho: domínio cabeça de miosina (PF00063); Rosa: domínio UBA (PF00627)

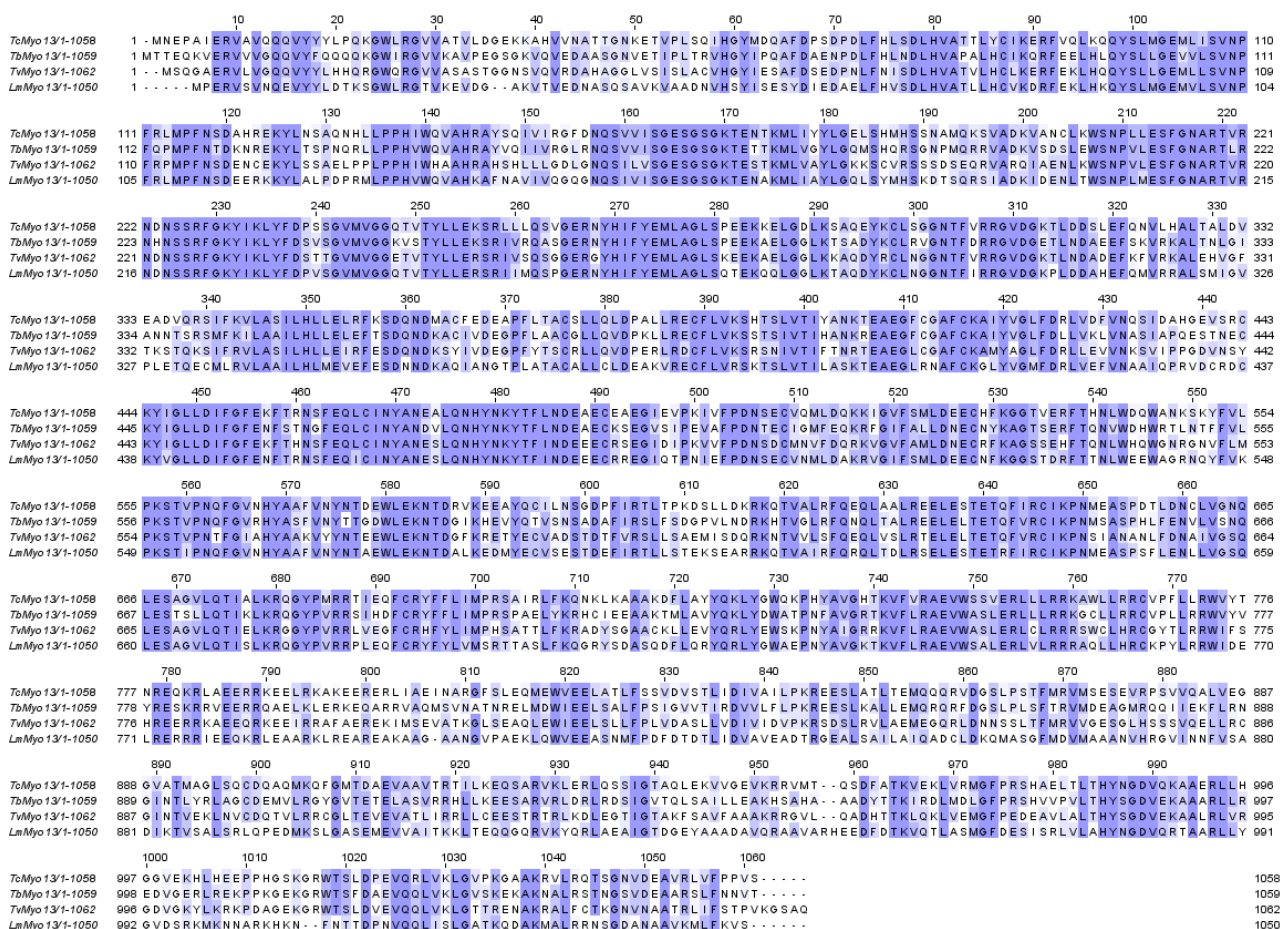


FIGURA 23 – ALINHAMENTO DA MYO13 DE *T. cruzi*, *T. brucei*, *T. vivax* e *L. major*

NOTA: Quanto mais escura a coloração, maior a semelhança entre os aminoácidos das diferentes sequências.

NOTA: Quanto mais escura a coloração, maior a semelhança entre os aminoácidos das diferentes sequências.

TABELA 5 – IDENTIDADE E SIMILARIDADE DAS MIOSINAS DE CLASSE I E XIII DE *T. cruzi* COM AS MIOSINAS DE MESMA CLASSE DE OUTROS ORGANISMOS

Organismo	Identidade	Similaridade
Myo1		
<i>T. brucei</i>	69%	81%
<i>T. vivax</i>	63%	75%
<i>L. major</i>	52%	66%
<i>H. sapiens</i>	44%	59%
<i>D. melanogaster</i>	43%	60%
<i>C. elegans</i>	47%	65%
<i>S. cerevisiae</i>	44%	60%
<i>A. thaliana</i>	38%	58%
Myo13		
<i>T. brucei</i>	59%	72%
<i>T. vivax</i>	56%	72%
<i>L. major</i>	55%	70%

As nove miosinas de *T. cruzi* (myo1 e 13 – miosinas comuns a todos os tripanossomatídeos; e myoA, B, C, D, E, F e G – miosinas órfãs, exclusivas de *T. cruzi*) têm pouca semelhança entre si. O alinhamento feito com a região da cabeça de todas as miosinas (FIGURA 26) mostra que, mesmo dentro do domínio motor, a conservação ocorre apenas em determinadas regiões. O alinhamento foi feito utilizando o software ClustalW2 (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) com os parâmetros padrão e o resultado foi mostrado usando o software JALVIEW (disponível em <http://www.jalview.org/download.html>) usando o esquema de cores *BLOSUM62* Score, com valor de visibilidade de conservação 20.

O quadro 1 mostra a identidade e similaridade entre as miosinas, quando comparadas duas a duas, utilizando a ferramenta *blastp* suíte (disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq) com os parâmetros padrão. Estes alinhamentos foram realizados colocando-se as duas sequências inteiras, mas em todos os casos, o programa alinhou apenas a região da cabeça.

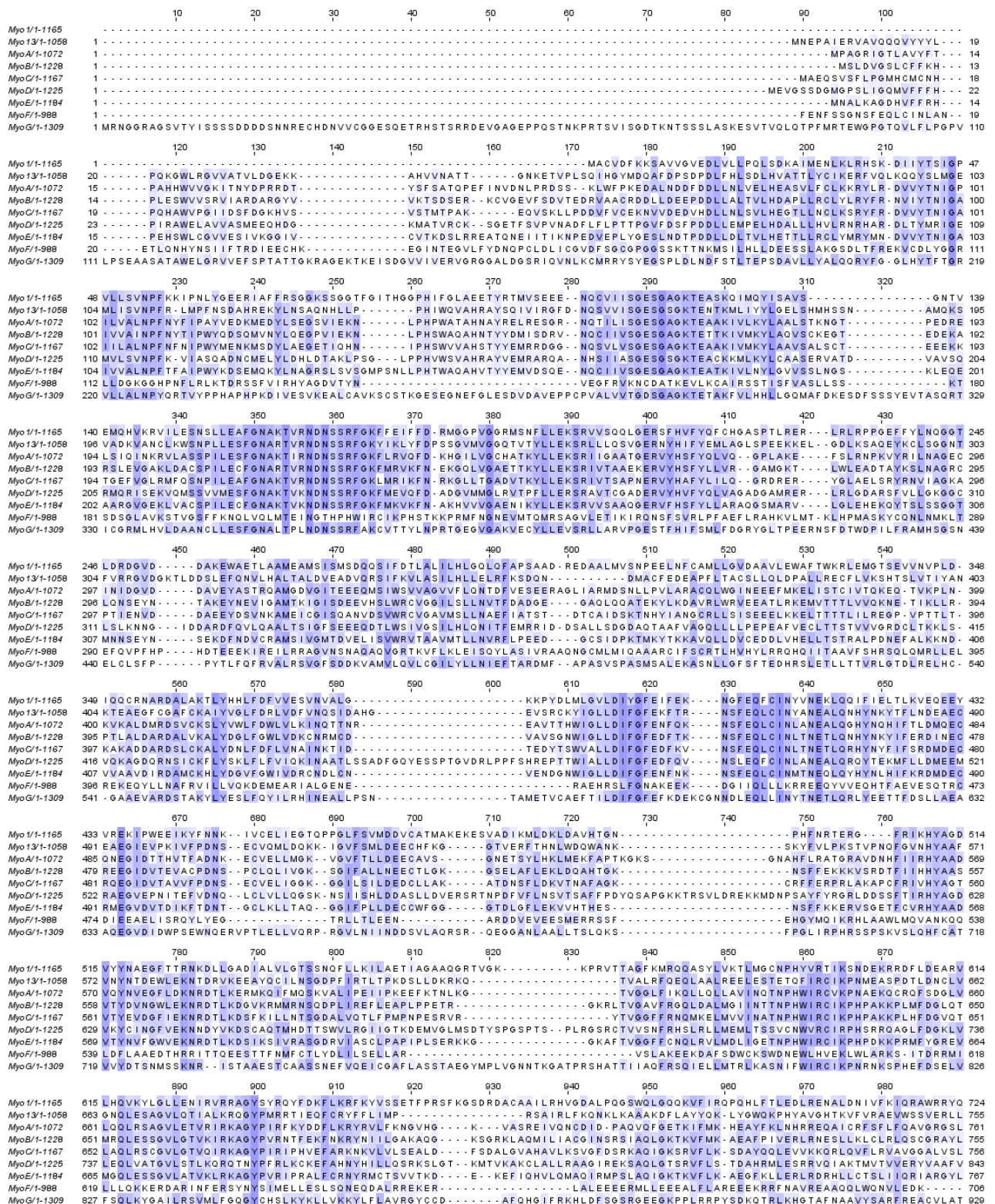


FIGURA 25 – ALINHAMENTO DA REGIÃO DA CABEÇA DE TODAS AS MIOSINAS DE *T. cruzi*

NOTA: Quanto mais escura a coloração, maior a semelhança entre os nucleotídeos das diferentes seqüências.

	Myo1	Myo13	MyoA	MyoB	MyoC	MyoD	MyoE	MyoF
Myo13	31% (49%)							
MyoA	34% (52%)	35% (55%)						
MyoB	32% (50%)	35% (52%)	44% (61%)					
MyoC	33% (51%)	33% (51%)	45% (63%)	48% (65%)				
MyoD	28% (47%)	29% (47%)	33% (53%)	32% (50%)	33% (51%)			
MyoE	30% (50%)	33% (52%)	39% (57%)	53% (68%)	45% (62%)	32% (52%)		
MyoF	28% (46%)	33% (46%)	39% (57%)	36% (51%)	36% (53%)	27% (45%)	36% (50%)	
MyoG	25% (43%)	27% (46%)	27% (43%)	29% (45%)	27% (42%)	27% (43%)	28% (43%)	22% (43%)

QUADRO 1 – RELAÇÃO DE SEMELHANÇA ENTRE TODAS AS MIOSINAS DE *T. cruzi*
 NOTA: Porcentagens de identidade e similaridade (entre parênteses) entre as miosinas.

4.2 CLONAGEM DOS GENES E FRAGMENTOS EM VETORES DA PLATAFORMA GATEWAY®

A fim de se obter anticorpos específicos contra as miosinas, que foram utilizados em imunoenaios para o estudo destas proteínas, fragmentos das miosinas foram clonados em vetores da plataforma Gateway®, expressos em bactérias *E. coli*, purificados e inoculados em camundongos para produção de anticorpos.

Utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a CDS completa, e para as regiões da cabeça e da cauda, três amplificações foram realizadas para cada gene: myo1 inteira (3498 pb), cabeça (2109 pb) e cauda (1448), e myo13 inteira (3177 pb), cabeça (2352 pb) e cauda (885 pb). A primeira reação de amplificação em cadeia realizada foi feita utilizando a enzima *Pfu* DNA polimerase, com 50°C de temperatura de anelamento e 5 minutos de tempo de extensão. O resultado observado nas figuras 26 A (myo1) e 26 B (myo13) mostra que apenas a myo1 inteira não foi amplificada nestas condições, mas foi posteriormente amplificada utilizando a mesma enzima e temperatura de anelamento com 5 minutos de tempo de extensão (FIGURA 26 C).

Todos os produtos de PCR obtidos foram utilizados para clonagem na plataforma Gateway®, utilizando o vetor de entrada pDONR™221. Após a reação de recombinação, os vetores foram transformados em células *E. coli* DH5-α cálcio-competentes que foram cultivadas em placas de cultura contendo o antibiótico apropriado para a seleção das bactérias transformadas. Algumas colônias crescidas

foram transferidas para uma placa referência, a fim de serem identificadas. Destas, cinco foram utilizadas para realização de *toothpick*. Como controle, foi utilizado o vetor pDONRTM221 sem inserto, que possui 4762 pares de bases, sendo que 2246 pares de bases são perdidos durante a recombinação. Assim, dependendo do tamanho do inserto, se maior ou menor do que 2246 pares de bases, o tamanho do vetor era maior ou menor que o vetor controle. Quando não era observada nenhuma colônia positiva, mais colônias eram utilizadas para *toothpick*. Após algumas tentativas, foram obtidos clones positivos para as duas miosinas e seus fragmentos. A figura 27 mostra os géis de *toothpick* onde há ao menos uma colônia positiva para cada inserto. Identificados os clones positivos, os mesmos foram utilizados para extração dos plasmídeos e os géis que mostram essas purificações estão mostrados na figura 28.

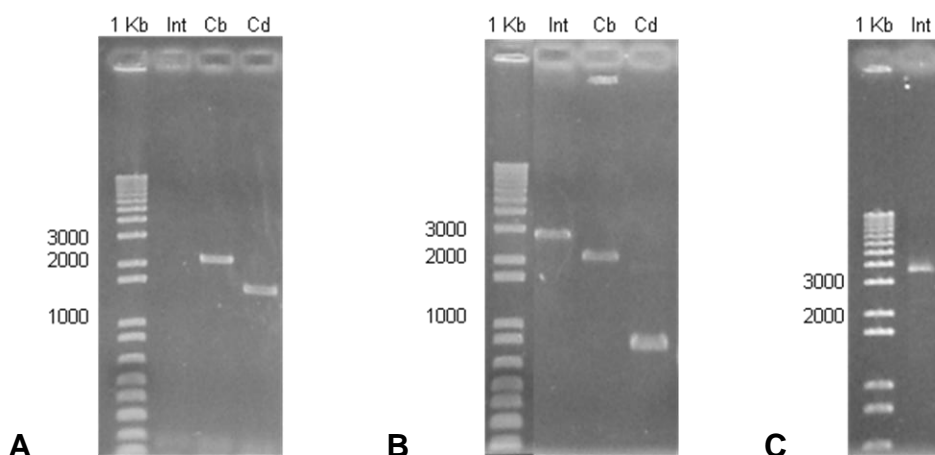


FIGURA 26 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR DAS CDS E FRAGMENTOS DAS MIOSINAS
NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases.

LEGENDA: **A e C:** myo1; **B:** myo13; 1 Kb: marcador de peso molecular 1 Kb Plus; Int: CDS inteira; Cb: região da cabeça; Cd: região da cauda

Para certificar de que os plasmídeos extraídos possuíam o inserto correto, foi realizada PCR dos plasmídeos com a enzima *Taq* DNA polimerase e os mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificação a partir do DNA genômico. Todos os insertos foram amplificados, indicando que o vetor deve estar correto (FIGURA 29). A clonagem foi ainda confirmada através de sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos M13, cujas sequências estão presentes no vetor pDONRTM221. O resultado do alinhamento foi comparado com a sequência do banco de dados e todas as inserções estão corretas. Os sequenciamentos foram realizados por *Macrogen Inc.* (Seoul, Korea).

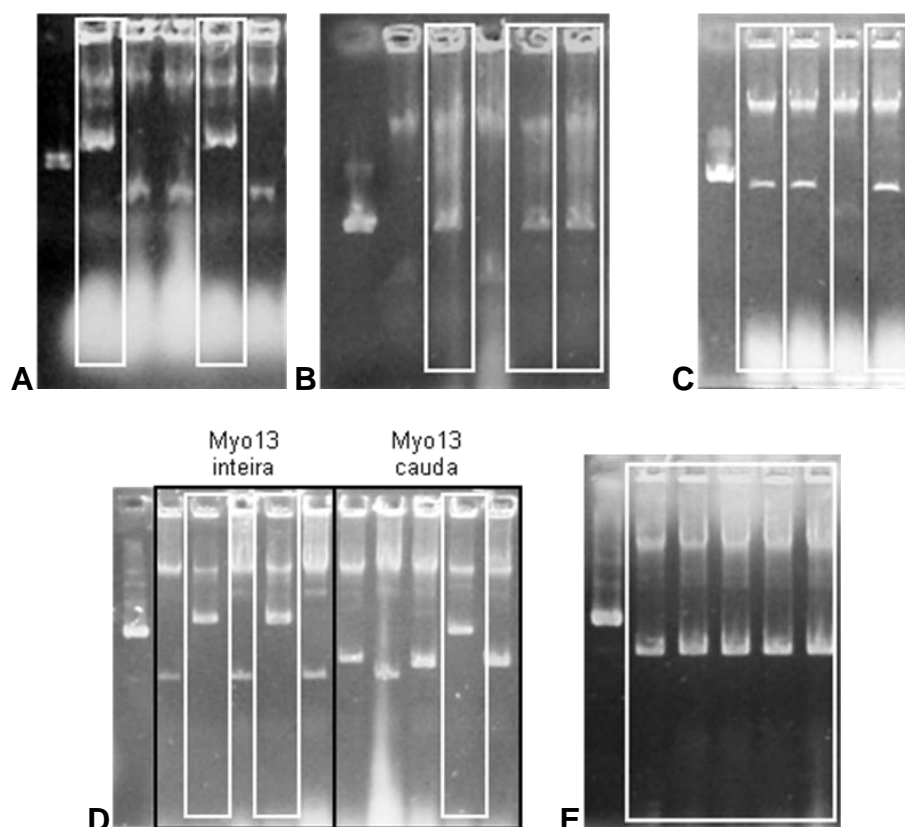


FIGURA 27 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA BACTERIANO DOS CLONES OBTIDOS POR *TOOTHPICK*

NOTA: A primeira coluna de cada gel corresponde ao controle pDONRTM221. Os retângulos brancos estão demarcando as colunas com clones possivelmente positivos; os retângulos pretos na figura D estão demarcando os vetores com diferentes insertos.

LEGENDA: **A:** inserto myo1 inteira; **B:** inserto myo1 cabeça; **C:** inserto myo1 cauda; **D:** insertos myo13 inteira e cabeça; **E:** myo13 cauda

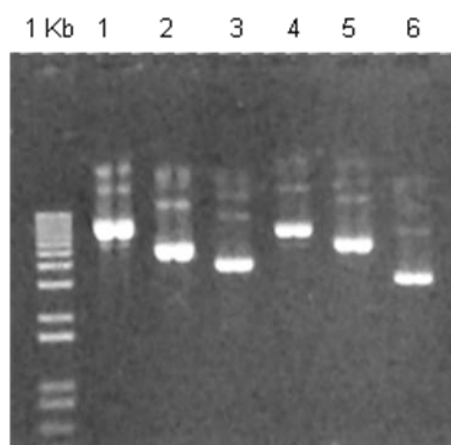


FIGURA 28 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS pDONRTM221

LEGENDA: 1 Kb: marcador de peso molecular 1 Kb Plus; myo1 inteira (1), cabeça (2) e cauda (3) e myo13 inteira (4), cabeça (5) e cauda (6)

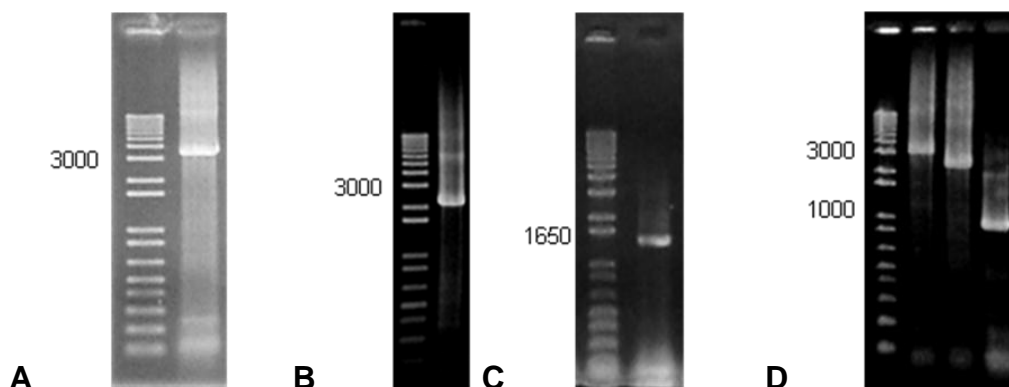


FIGURA 29 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PCR DOS PLASMÍDEOS pDONR™221

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem aos tamanhos dos fragmentos em pares de bases.

LEGENDA: myo1 inteira (A), cabeça (B) e cauda (C), e myo13 inteira, cabeça e cauda (D)

4.2.1 Recombinação dos fragmentos em vetores para expressão heteróloga da proteína em *E. coli*

Os vetores contendo os fragmentos cabeça e cauda das miosinas foram recombinados para o vetor de expressão heteróloga em *E. coli* pDEST™17. A reação de recombinação foi transformada em células *E. coli* DH5-α cálcio-competentes que foram cultivadas em placas de cultura contendo o antibiótico apropriado para seleção das bactérias transformadas, visto que esse vetor possui o gene para resistência ao antibiótico ampicilina. Algumas colônias foram transferidas para uma placa referência, a fim de serem identificadas. Destas, cinco foram utilizadas para realização de *toothpick*, com aproximadamente 150 ng do vetor pDEST™17 com tampão de amostra glicerol 1x como controle. O vetor pDEST™17 possui 6354 pares de bases, sendo que 1683 pares de bases são perdidos durante a recombinação. Assim, dependendo do tamanho do inserto, se maior ou menor do que 1683 pares de bases, o tamanho do vetor será maior ou menor que o vetor controle. A figura 30 mostra os géis de *toothpick* onde todos os clones parecem positivos.

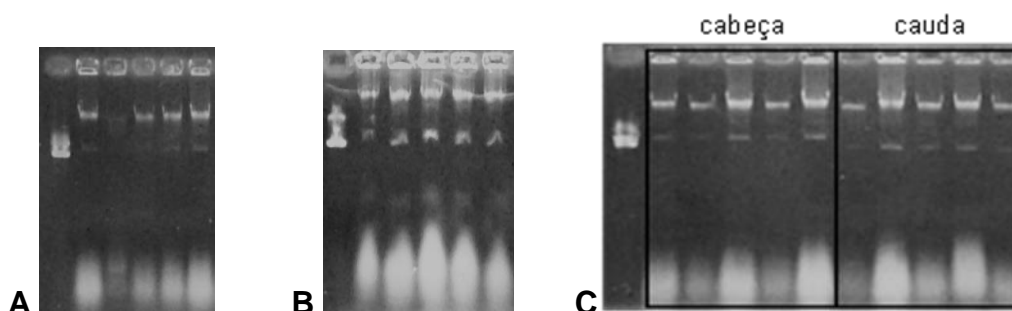


FIGURA 30 – PERFIL ELETROFORÉTICO DE DNA BACTERIANO DOS CLONES OBTIDOS POR *TOOTH PICK*

NOTA: A primeira coluna de cada gel corresponde ao controle pDESTTM17. Os retângulos pretos na figura C estão demarcando os dois vetores com diferentes inserts.

LEGENDA: insertos myo1 cabeça (A) e cauda (B), e myo13 cabeça e cauda (C)

O primeiro clone de cada gel de *toothpick* foi utilizado para extração plasmidial (FIGURA 31 A) e, para confirmar se o inserto clonado estava correto, foi realizado PCR dos plasmídeos utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase e os mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificação a partir do DNA genômico. Todos os inserts foram amplificados com tamanho esperado (FIGURA 31 B), indicando que houve inserção do fragmento desejado.

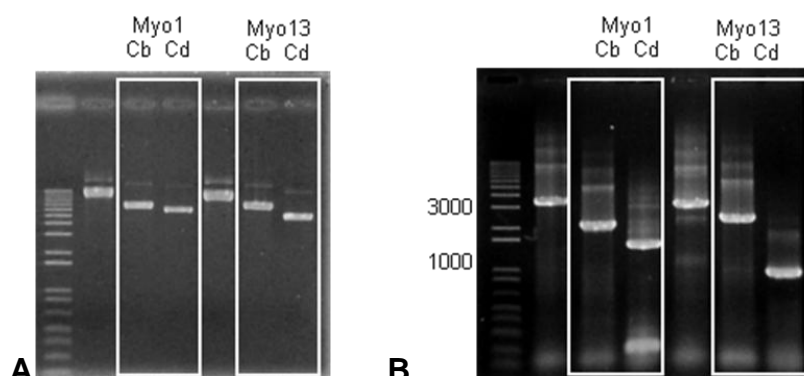


FIGURA 31 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS (A) E PCR DOS PLASMÍDEOS (B)

NOTA: Os retângulos brancos estão demarcando os dois genes; Os valores à esquerda do gel correspondem aos tamanhos dos fragmentos em pares de bases.

LEGENDA: Cb: cabeça; Cd: cauda

4.2.2 Recombinação das CDSs inteiras e caudas em vetores para expressão da proteína em *T. cruzi* fusionada a etiquetas

As CDSs inteiras e os fragmentos caudas das duas miosinas foram recombinados do vetor de entrada para o vetor pTcGFPN para expressão em *T.*

cruzi da proteína fusionada à proteína fluorescente GFP na extremidade N-terminal. A CDS inteira da *myo1* foi recombinação também para os vetores pTcPTP e pTcMYCN para expressão em *T. cruzi* da proteína fusionada às etiquetas TAP e c-myc, respectivamente, ambas na extremidade N-terminal. Até o momento, não foi obtido nenhum clone positivo da *myo13* no vetor pTcPTP. A recombinação foi confirmada de acordo com o tamanho dos plasmídeos em gel de agarose (FIGURA 32) e pela PCR realizada a partir destes plasmídeos.

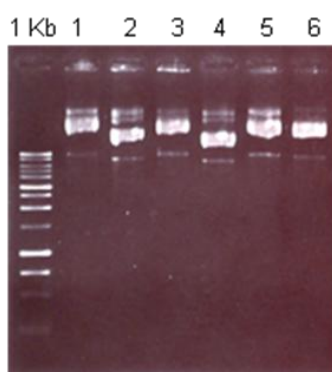


FIGURA 32 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS pTcGFPN, pTcPTP e pTcMYCN

LEGENDA: 1 Kb: marcador de peso molecular 1 Kb Plus; 1 a 4: vetor pTcGFPN com os insertos *myo1* inteira (1) e cauda (2), e *myo13* inteira (3), e cauda (4); 5: vetor pTcPTP com o inserto *myo1* inteira; 6: vetor pTcMYCN com o inserto *myo1* inteira

4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *E. coli*

Os vetores contendo os fragmentos da cabeça e da cauda das duas miosinas foram transformados em células *E. coli* BL21(DE3)pLysS cálcio-competentes para realização de um teste de expressão em 5 mL de meio cultura, após a indução com 1 mM IPTG. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE e foi realizado *western blot* utilizando o anticorpo anti-histidina já que as proteínas recombinantes possuem uma etiqueta de 6 histidinas, adicionadas pelo vetor pDESTTM17. Como pode ser observado nos géis de poliacrilamida corados com azul de coomassie (FIGURAS 33 A e C) e corroborado no *western blot* (FIGURAS 33 B e D), apenas a *myo13* cauda (33,1 kDa) teve boa expressão. A *myo1* cabeça (79,2 kDa) não expressou, a *myo1* cauda (53,6 kDa) expressou de forma fraca e a *myo13* cabeça (90 kDa) expressou de forma bastante degradada.

O fragmento *myo1* cabeça passou por outro teste de expressão, sendo

induzido em 2 mL com 1 mM IPTG, mas em 25°C durante 4 horas. De acordo com o resultado observado no gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie (FIGURA 34 A), parece que a proteína não foi expressa, mas o resultado do *western blot* mostrou que houve expressão da proteína recombinante (FIGURA 34 B).

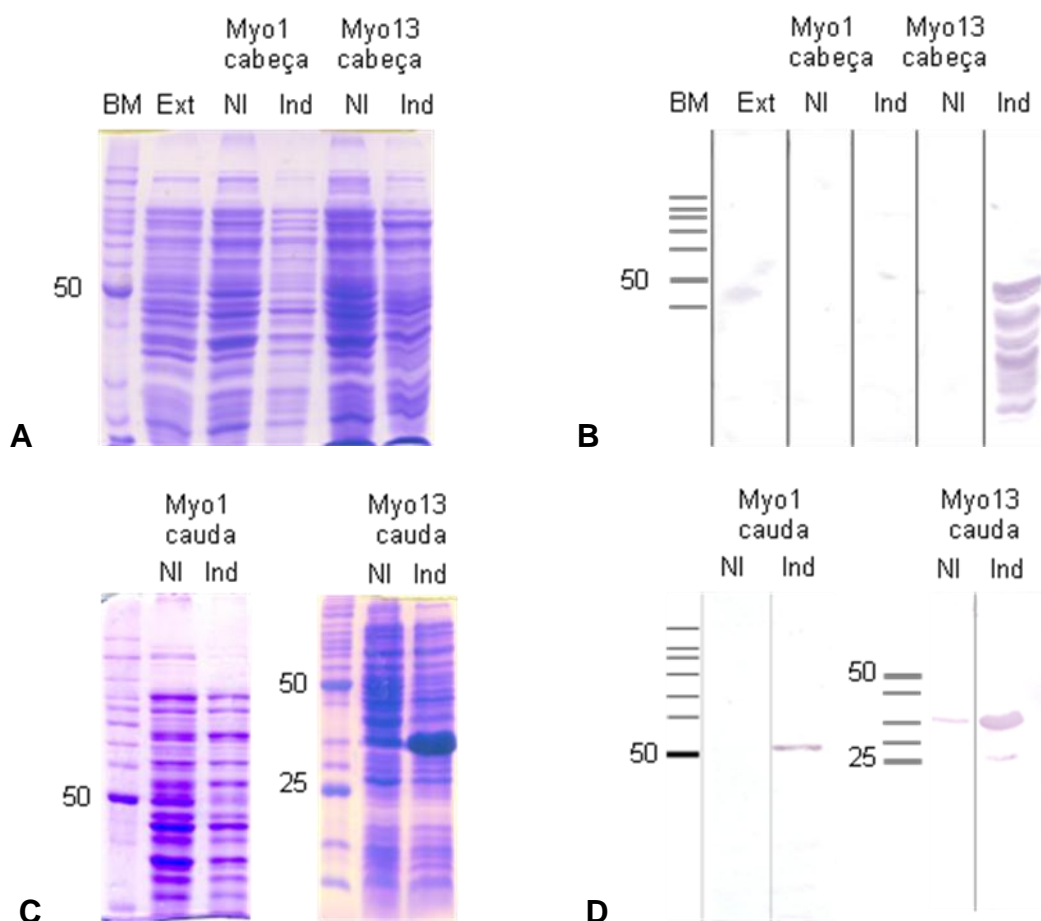


FIGURA 33 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO DOS FRAGMENTOS DE MIOSINAS

NOTA: Os valores à esquerda de cada figura corresponde ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A e B:** resultado do teste de expressão dos fragmentos cabeça da myo1 e da myo13; **C e D:** resultado do teste de expressão dos fragmentos cauda da myo1 e da myo13; **A e C:** géis de poliacrilamida corados com azul de coomassie; **B e D:** membranas de *western blot*; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; Ext: extrato de bactérias *E. coli* não transformadas; NI: extrato de bactérias não induzido; Ind: extrato de bactérias induzido

As culturas foram então induzidas para expressão em inóculo de 300 mL de meio de cultura, nas mesmas condições do teste de expressão quando foi detectado a expressão da proteína recombinante.

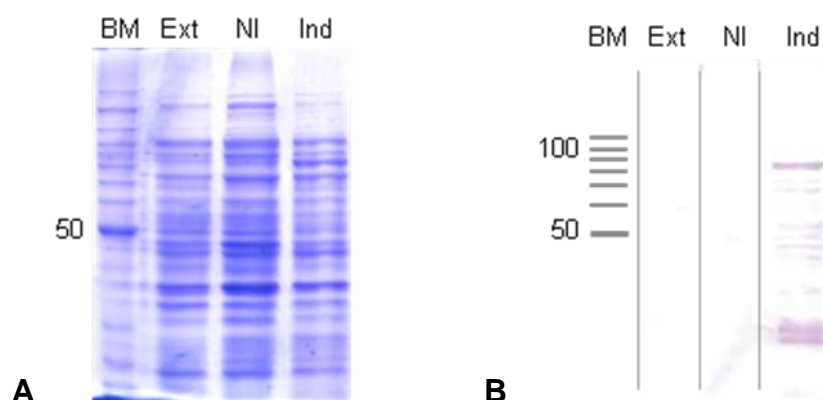


FIGURA 34 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO TESTE DE EXPRESSÃO DO FRAGMENTO MYO1 CABEÇA

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A**: gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie; **B**: membrana de *western blot*; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; Ext: extrato de bactérias *E. coli* não transformadas; NI: extrato de bactérias não induzido; Ind: extrato de bactérias induzido

4.3.1 Myo1 cabeça (79,2 kDa)

O resultado da expressão do fragmento Myo1 cabeça está mostrado na figura 35. No gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie, observamos a presença de proteína na fração solubilizada em tampão com 8 M ureia, e o *western blot* realizado com o anticorpo anti-histidina e revelado durante 1 minuto e 20 segundos detectou a proteína nesta fração, indicando que a proteína foi expressa e está presente apenas na fração solubilizada em tampão com 8 M ureia.

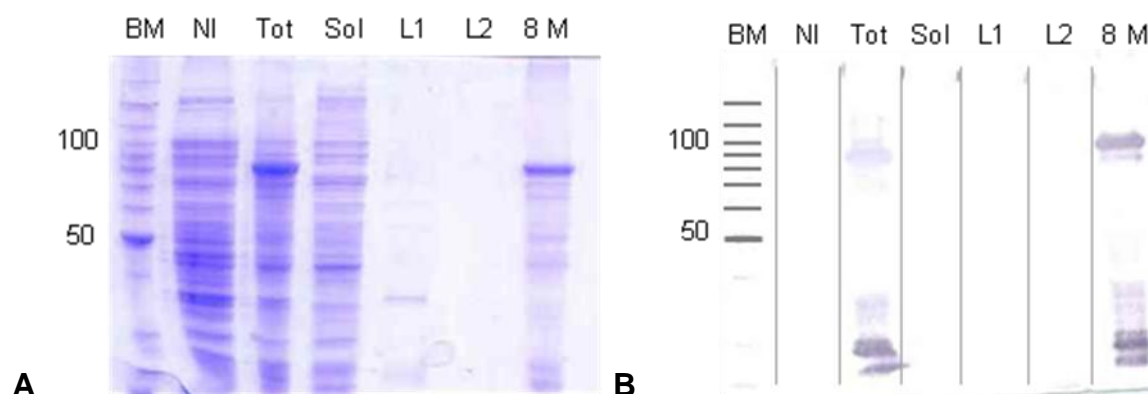


FIGURA 35 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO1 CABEÇA

NOTA: Os valores à esquerda da figura representam o tamanho do fragmento em kDa.

LEGENDA: **A**: gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie; **B**: membrana de *western blot*; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; NI: extrato de bactérias não induzido; Tot: extrato total de proteínas da bactéria; Sol: extrato de proteínas solúveis; L1: primeira lavagem; L2: segunda lavagem; 8 M: extrato solubilizado em tampão com 8 M ureia

A fração solubilizada em tampão com 8 M ureia foi submetida a uma separação eletroforética em SDS-PAGE e a banda correspondente à proteína recombinante foi recortada do gel e posteriormente eluída através de eletroeluição. Da primeira eluição foi obtido 1 mL de solução com 0,353 mg/mL proteína, e da segunda eluição foi obtido 1 mL de solução com 0,285 mg/mL proteína. A figura 36 mostra um gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie contendo 5 µL da fração solubilizada em tampão com 8 M ureia e das duas frações eluídas do gel.

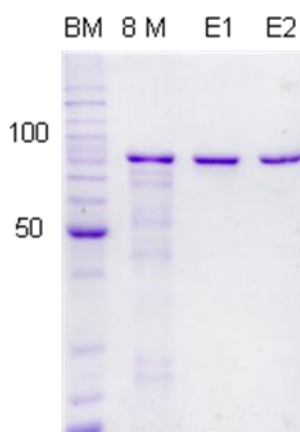


FIGURA 36 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PURIFICAÇÃO POR ELETROELUIÇÃO

NOTA: Os valores à esquerda do gel correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 8 M: fração solubilizada em tampão contendo 8 M ureia; E1: primeira eluição; E2: segunda eluição

4.3.2 Myo1 cauda (53,6 kDa)

O resultado da expressão do fragmento Myo1 cauda está mostrado na figura 37. No gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie, observamos a presença de proteína na fração solubilizada em tampão com 8 M ureia, e o *western blot* realizado com o anticorpo anti-histidina e revelado durante 3 minutos detectou a proteína nesta fração, indicando que a proteína foi expressa e está presente apenas na fração solubilizada em tampão com 8 M ureia.

A fração solubilizada em tampão com 8 M ureia foi submetida a uma separação eletroforética em SDS-PAGE e a banda correspondente à proteína recombinante foi recortada do gel e posteriormente eluída através de eletroeluição. Da primeira eluição foi obtido 1 mL de solução com 0,477 mg/mL proteína, da segunda eluição foi obtido 1 mL de solução com 0,340 mg/mL proteína e da terceira

eluição foi obtido 1 mL de solução com 0,192 mg/mL proteína. A figura 38 mostra um gel de poliácridamida corado com azul de coomassie contendo 5 μ L da fração solubilizada em tampão com 8 M ureia e das duas frações eluídas do gel.

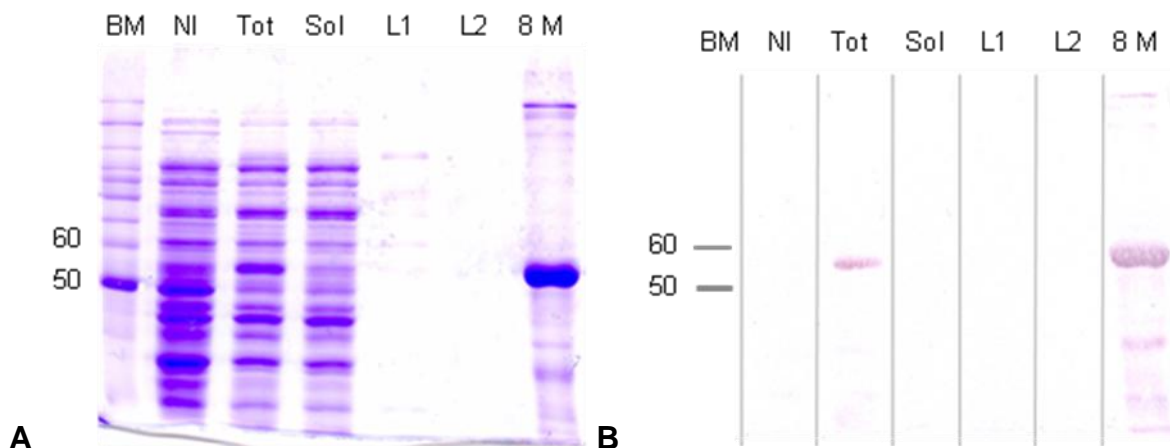


FIGURA 37 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO1 CAUDA

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A**: gel de poliácridamida corado com azul de coomassie; **B**: membrana de *western blot*; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; NI: extrato de bactérias não induzido; Tot: extrato total de proteínas da bactéria; Sol: extrato de proteínas solúveis; L1: primeira lavagem; L2: segunda lavagem; 8 M: extrato solubilizado em tampão com 8 M ureia

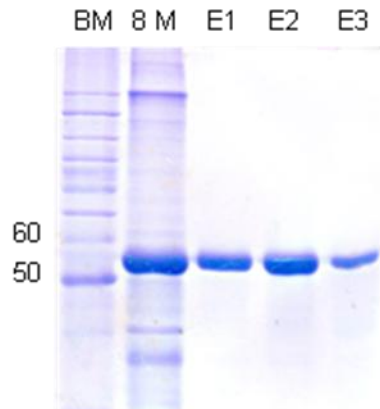


FIGURA 38 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PURIFICAÇÃO POR ELETROELUIÇÃO

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 8 M: fração solubilizada em tampão contendo 8 M ureia; E1: primeira eluição; E2: segunda eluição; E3: terceira eluição

4.3.3 Myo13 cabeça (90 kDa)

O resultado da expressão do fragmento Myo13 cabeça está mostrado na figura 39. No gel de poliácridamida corado com azul de coomassie, observamos a

presença de pequena quantidade de proteína na fração solubilizada em tampão com 8 M ureia, e o *western blot* realizado com o anticorpo anti-histidina e revelado durante 3 minutos detectou a proteína de forma bastante degradada na fração total, e uma quantidade pequena de proteína na fração solubilizada em tampão com 8 M ureia, indicando que a proteína está sendo expressa pelas bactérias mas está sendo degradada ou pela própria bactéria ou pela manipulação durante o preparo das amostras.

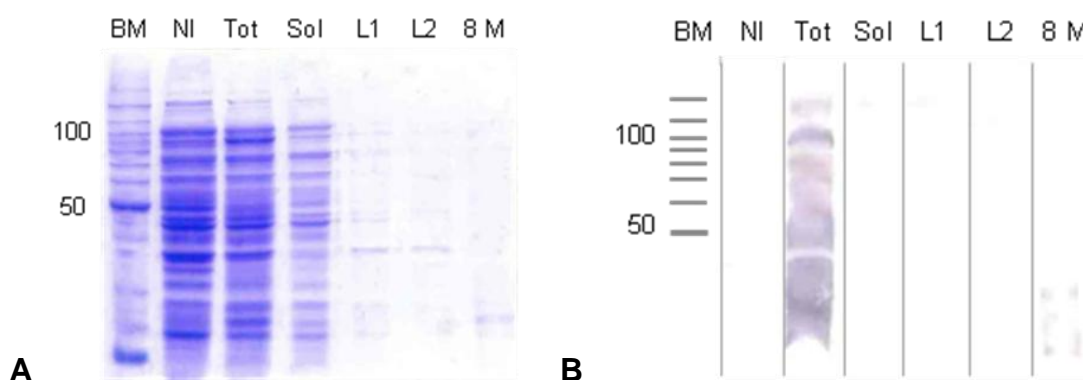


FIGURA 39 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CABEÇA

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A**: gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie; **B**: membrana de *western blot*; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; NI: extrato de bactérias não induzido; Tot: extrato total de proteínas da bactéria; Sol: extrato de proteínas solúveis; L1: primeira lavagem; L2: segunda lavagem; 8 M: extrato solubilizado em tampão com 8 M ureia

Caso a degradação da proteína estivesse ocorrendo durante as etapas de sonicação (vide Material e Métodos), foi realizada uma nova expressão e as lavagens com tampão com 2 M ureia foram realizadas apenas ressuspensando as células, sem sonicar. Durante o preparo desta amostra, foi retirada uma pequena quantidade do sedimentado após a centrifugação que separa as proteínas solúveis das insolúveis, e a este sedimento foi adicionado 100 µL do tampão de amostra 4x. O gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie (FIGURA 40 A) não mostrou proteínas nas frações lavadas com tampão com 2 M ureia e nem na fração solubilizada em tampão com 8 M ureia. O resultado do *western blot* (FIGURA 40 B) mostrou que a proteína está presente na fração total e também na fração insolúvel, então ela provavelmente foi perdida durante o processo de solubilização no tampão 8 M ureia.

Como a proteína está sendo bastante degradada, a expressão foi novamente repetida e, durante a sonicação para lise das células, foi adicionado 1 mM do inibidor de proteases PMSF como tentativa de inibir possíveis proteases que

poderiam estar degradando a proteína. As lavagens com o tampão com 2 M ureia foram feitas novamente apenas com ressuspensão do sedimento sem sonicar e a suspeita de que a proteína provavelmente estava sendo perdida durante a centrifugação após a solubilização com o tampão com 8 M ureia fez com que não realizássemos a centrifugação. Para que o conteúdo fosse bem ressuspensionado, essa etapa foi sonicada por 2 pulsos de 15 segundos a potência 7, e esta solução foi armazenada. A figura 41 mostra o resultado desta expressão, mostrando que a proteína está presente na fração solubilizada com o tampão com 8 M ureia e que realmente estávamos perdendo durante a centrifugação.

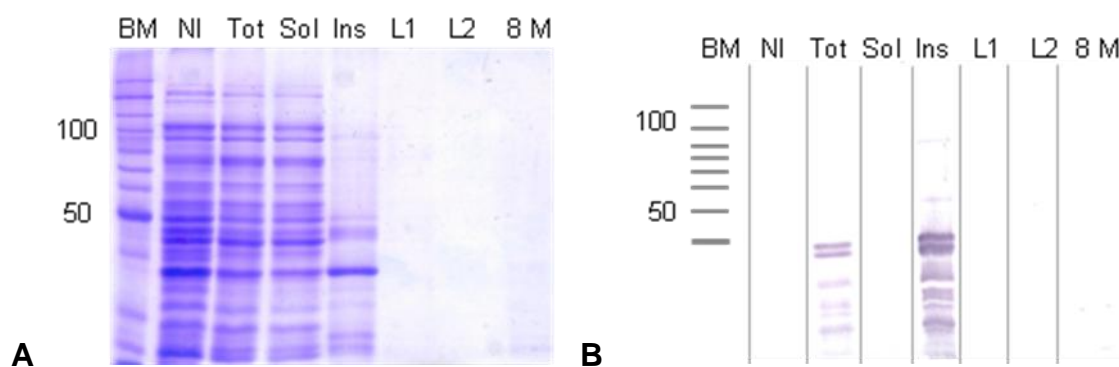


FIGURA 40 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CABEÇA

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A**: gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie; **B**: membrana de *western blot*; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*™; NI: extrato de bactérias não induzido; Tot: extrato total de proteínas da bactéria; Sol: extrato de proteínas solúveis; Ins: extrato de proteínas insolúveis; L1: primeira lavagem; L2: segunda lavagem; 8 M: extrato solubilizado em tampão com 8 M ureia

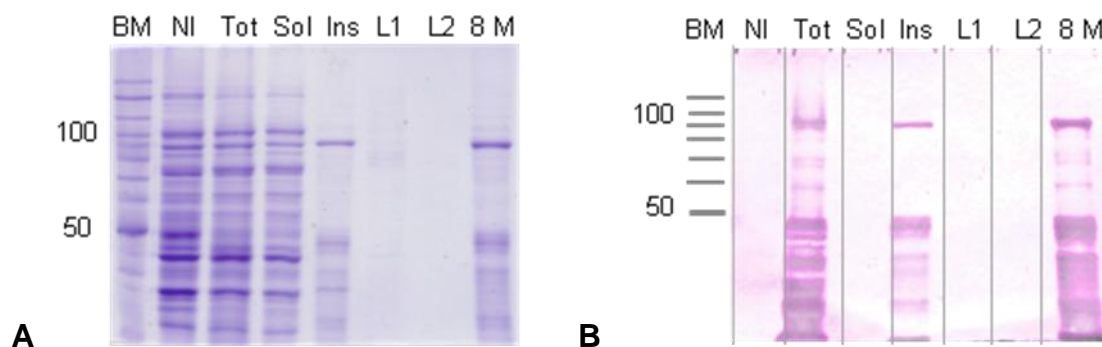


FIGURA 41 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CABEÇA

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A**: gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie; **B**: membrana de *western blot*; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*™; NI: extrato de bactérias não induzido; Tot: extrato total de proteínas da bactéria; Sol: extrato de proteínas solúveis; Ins: extrato de proteínas insolúveis; L1: primeira lavagem; L2: segunda lavagem; 8 M: extrato solubilizado em tampão com 8 M ureia

Pelo fato de que a proteína permanece bastante degradada, achamos que seria inviável fazer purificação cortando-se a banda do gel, pois parte da quantidade de proteína é perdida durante este processo, e neste caso a proteína já está presente em pouca quantidade, portanto recuperaríamos apenas uma pequena quantidade da proteína purificada. Assim, foi decidido dialisar a proteína contida na fração solubilizada com tampão com 8 M ureia para retirada da ureia pois, como observado no resultado do *western blot*, esta fração contém principalmente a proteína purificada de diversos tamanhos devido à degradação, e esta fração foi utilizada para as inoculações.

4.3.4 Myo13 cauda (33,1 kDa)

Como já era esperado devido à sua alta expressão no teste em pequeno volume, a proteína Myo13 cauda teve boa expressão em um volume maior como pode ser observado no gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie (FIGURA 42 A) e confirmado por *western blot* (FIGURA 42 B) realizado com o anticorpo anti-histidina e revelado durante 3 minutos, presente na fração solubilizada em 8 M ureia.

A fração solubilizada em tampão com 8 M ureia foi submetida a uma separação eletroforética em SDS-PAGE e a banda correspondente à proteína recombinante foi recortada do gel e posteriormente eluída por eletroeluição. Da primeira eluição foi obtido 3 mL de solução com 0,390 mg/mL proteína, da segunda foi obtido 2 mL de solução com 0,505 mg/mL proteína e da terceira foi obtido 0,75 mL de solução com 0,155 mg/mL proteína. A figura 43 mostra um gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie contendo 5 µL da fração solubilizada em tampão com 8 M ureia e das três eluições do gel.

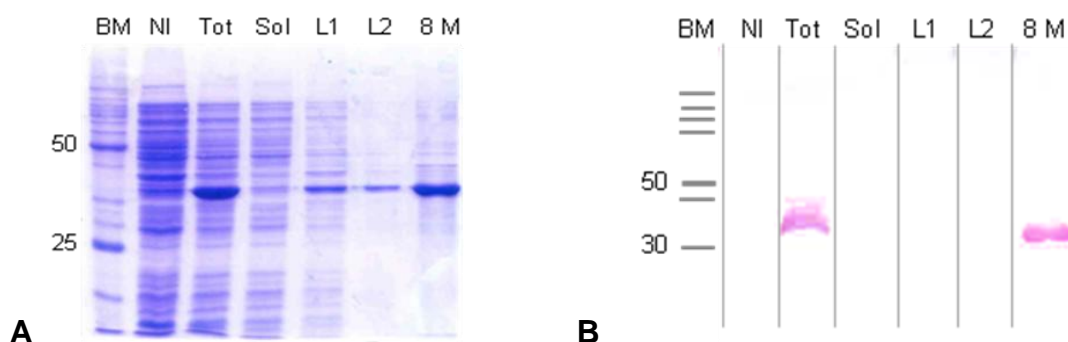


FIGURA 42 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE PROTEÍNA MYO13 CAUDA

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A**: gel de poliacrilamida corado com azul de coomassie; **B**: membrana de *western blot*; NI: extrato de bactérias não induzido; Tot: extrato total de proteínas da bactéria; Sol: extrato de proteínas solúveis; L1: primeira lavagem; L2: segunda lavagem; 8 M: extrato solubilizado em tampão com 8 M ureia

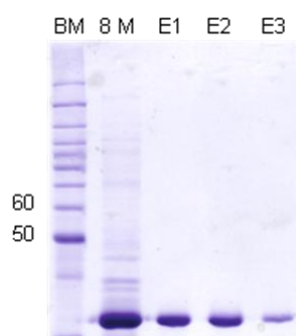


FIGURA 43 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PURIFICAÇÃO POR GEL PREPARATIVO

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark*™; 8 M: fração solubilizada em tampão contendo 8 M ureia; E1: primeira eluição; E2: segunda eluição; E3: segunda eluição

4.4 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ATRAVÉS DA INOCULAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM CAMUNDONGOS

4.4.1 Avaliação dos anticorpos presentes no soro pré-imune dos camundongos e inoculação da proteína recombinante

Aproximadamente 150 μ L de sangue foi retirado da cauda de nove camundongos, denominados 1 a 9 e, após a obtenção do soro, o mesmo foi testado em um ensaio de *western blot* contra o extrato proteico de *T. cruzi* imobilizado em membrana de nitrocelulose. O resultado mostrado na figura 44 mostra que apenas a

camundongo 1 possuía anticorpos específicos contra alguma proteína de *T. cruzi* e, portanto, ele não foi utilizado. Os outros oito camundongos foram utilizados para as inoculações com as proteínas myo1 cabeça (camundongos 2 e 3), myo1 cauda (camundongos 6 e 7), myo13 cabeça (camundongos 8 e 9) e myo13 cauda (camundongos 4 e 5). A fim de facilitar a identificação, os camundongos 2 a 9 serão respectivamente denominados de 1 h I, 1 h II, 13 t I, 13 t II, 1 t I, 1 t II, 13 h I e 13 h II, de acordo com a proteína inoculada (myo1 ou myo13), o fragmento cabeça (h – de *head*, em inglês) ou cauda (t – de *tail*, em inglês) e I ou II para identificar os dois camundongos para a mesma proteína.

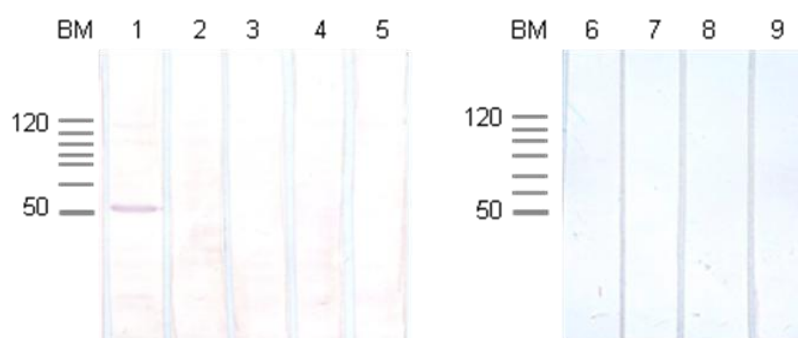


FIGURA 44 – RESULTADO DO TESTE PRÉ-IMUNE DE NOVE CAMUNDONGOS

NOTA: OS Valores à esquerda da figura corresponde ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 1 – 9: identificação dos nove camundongos

As inoculações ocorreram com intervalos de duas semanas, e sete dias após a quarta inoculação foi retirado aproximadamente 150 µL de sangue da cauda dos camundongos. O soro obtido foi utilizado em *western blot* contra extrato proteico de *T. cruzi* e contra a proteína recombinante imobilizados em membrana de nitrocelulose para a verificação da produção de anticorpos contra a proteína. Os resultados obtidos estão mostrados de forma separada para cada proteína.

4.4.2.1 Myo1 (132,6 kDa)

Como observado na figura 45, os quatro camundongos produziram anticorpos contra as proteínas recombinantes – camundongos 1 h I e 1 h II para o fragmento myo1 cabeça e camundongos 1 t I e 1 t II para o fragmento myo1 cauda. No entanto, o soro do camundongo 1 h I (que recebeu o fragmento myo1 cabeça)

não reagiu contra nenhuma proteína do extrato de *T. cruzi*. O soro do camundongo 1 h II (que também recebeu o fragmento myo1 cabeça) reagiu contra uma proteína de aproximadamente 130 kDa, que seria o tamanho esperado, mas reagiu também contra uma proteína de aproximadamente 90 kDa. Os soros dos dois camundongos (1 t I e 1 t II) que receberam o fragmento myo1 cauda reagiram contra uma proteína de aproximadamente 210 kDa do extrato de *T. cruzi*, mas o soro do camundongo 1 t I reagiu também contra uma proteína de aproximadamente 130 kDa, o tamanho esperado, e outra proteína de aproximadamente 90 kDa.

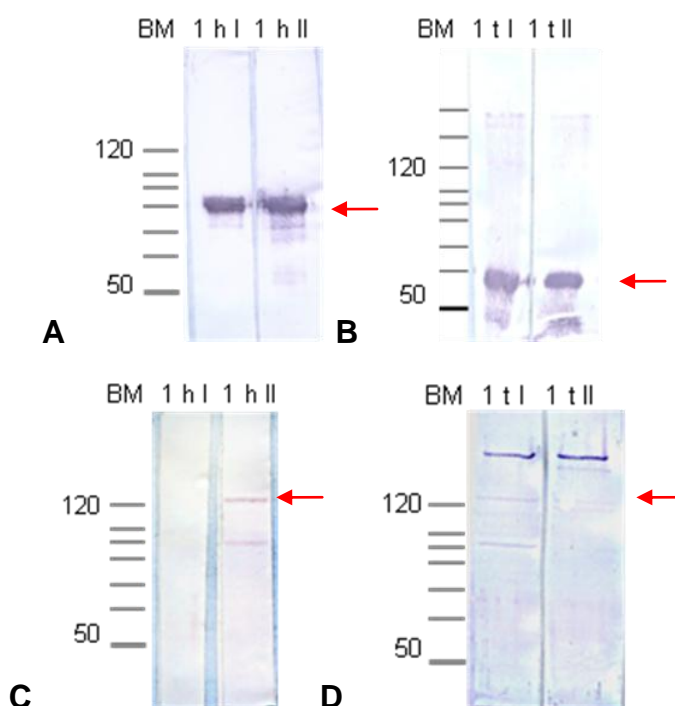


FIGURA 45 – RESULTADO DO *WESTERN BLOT* UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO1 APÓS A QUARTA INOCULAÇÃO

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa; as setas vermelhas indicam os tamanhos esperados aproximados para os fragmentos cabeça (79,2 kDa) e cauda (53,6 kDa) da myo1, assim como o tamanho dela inteira (132,6 kDa).

LEGENDA: **A e B:** *western blot* contra a proteína recombinante; **C e D:** *western blot* contra o extrato proteico de *T. cruzi*; **A e C:** incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo1 cabeça; **B e D:** incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo1 cauda; BM: marcador de peso molecular *BenchMark™*; 1 h I, 1 h II, 1 t I e 1 t II: identificação dos camundongos

Mais duas inoculações foram realizadas para cada camundongo e, sete dias após a sexta inoculação, os camundongos foram sedados e o sangue total foi obtido por punção cardíaca. Foi realizado novo *western-blot* com o soro total e o resultado está representado na figura 46. O resultado dos soros produzidos pelos camundongos inoculados com o fragmento myo1 cabeça permaneceram semelhantes, ambos com revelação durante 5 minutos. Os soros dos camundongos

1 t I e 1 t II continuaram reagindo com a proteína de aproximadamente 220 kDa e reagiram fracamente com uma proteína de aproximadamente 130 kDa.

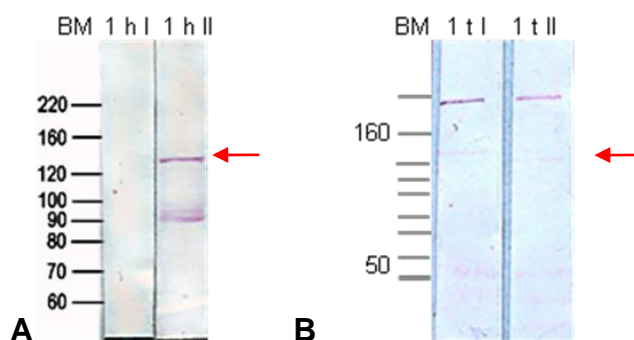


FIGURA 46 – RESULTADO DO *WESTERN BLOT* UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO1 CABEÇA

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa, as setas vermelhas indicam o tamanho esperado aproximado da myo1 inteira (132,6 kDa).

LEGENDA: **A**: incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo1 cabeça; **B**: incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo1 cauda; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 1 h I, 1 h II, 1 t I e 1 t II: identificação dos camundongos

4.4.2.2 Myo13 (120,5 kDa)

Como observado na figura 47, os quatro camundongos produziram anticorpos contra as proteínas recombinantes inoculadas – camundongos 13 h I e 13 h II para o fragmento myo13 cabeça e camundongos 13 t I e 13 t II para o fragmento myo13 cauda. Devido à degradação do fragmento cabeça, não foi possível inocular esta proteína purificada, e por isso foram produzidos anticorpos contra todas as proteínas presentes na fração solubilizada em 8 M ureia (vide item 4.3.3), e assim, os soros dos camundongos inoculados este fragmento reagiram com proteínas de diversos tamanhos, reconhecendo todo o extrato, como observado na figura 47 A. Os soros dos quatro camundongos reagiram para uma proteína de aproximadamente 120 kDa no extrato proteico de *T. cruzi*, mas reagiram também contra outras proteínas, como pode-se observar pela presença das diversas bandas.

Mais duas inoculações foram realizadas para cada camundongo e, sete dias após a sexta inoculação, os camundongos foram sedados e o sangue total foi obtido por punção cardíaca. Foi realizado novo *western blot* com o soro total e o resultado está representado na figura 48. O resultado do soro produzido pelo camundongo 13 h II permaneceu semelhante, mas agora o soro produzido pelo camundongo 13 h I

mostrou o aparecimento de outras bandas com uma intensidade mais fraca, ambos com revelação durante 5 minutos. Já o resultado dos soros dos camundongos inoculados com o fragmento myo13 cauda continuaram reconhecendo uma banda com tamanho compatível com o da proteína específica, e algumas bandas de menor intensidade, ambos com revelação durante 3 minutos.

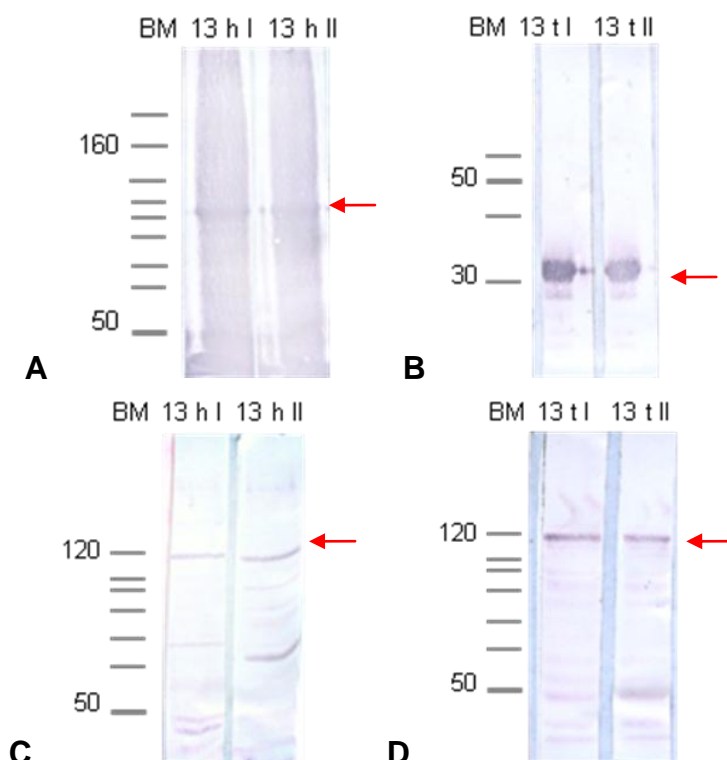


FIGURA 47 – RESULTADO DO *WESTERN BLOT* UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO13 APÓS A QUARTA INOCULAÇÃO

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa, as setas vermelhas indicam os tamanhos esperados aproximados para os fragmentos cabeça (90 kDa) e cauda (33,1 kDa) da myo13, assim como o tamanho dela inteira (120,5 kDa).

LEGENDA: **A e B:** *western blot* contra a proteína recombinante; **C e D:** *western blot* contra o extrato proteico de *T. cruzi*; **A e C:** incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo13 cabeça; **B e D:** incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo13 cauda; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 13 h I, 13 h II, 13 t I e 13 t II: identificação dos camundongos

4.4.3 Realização de *western blot* utilizando competidor com o anticorpo primário e purificação dos anticorpos

Para confirmar se os anticorpos eram específicos, ou seja, foram produzidos contra a proteína recombinante, foi realizado *western blot* competitivo dos camundongos 1 h II, 1 t I, 1 t II, 13 h I, 13 h II, 13 t I e 13 t II com 50 µg/mL da

proteína recombinante utilizada na inoculação adicionada ao soro dos camundongos. Assim, os anticorpos específicos contra a proteína recombinante se ligariam à proteína em solução e não à proteína imobilizada na membrana.

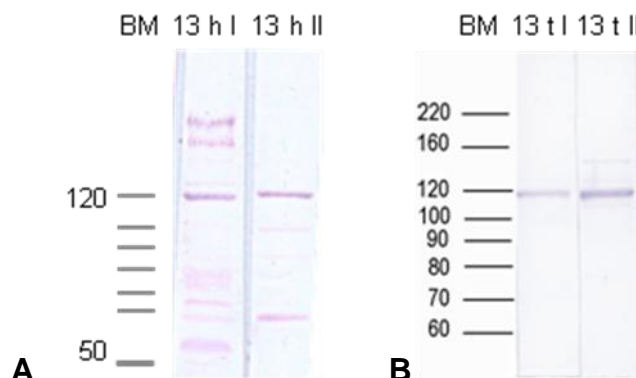


FIGURA 48 – RESULTADO DO *WESTERN BLOT* UTILIZANDO OS SOROS DOS CAMUNDONGOS QUE RECEBERAM FRAGMENTOS DA MYO13

NOTA: Os valores à esquerda dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa, as setas vermelhas indicam o tamanho esperado aproximado da myo13 inteira (120,5 kDa).

LEGENDA: **A**: incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo13 cabeça; **B**: incubação com soro dos camundongos inoculados com o fragmento myo13 cauda; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 13 h I, 13 h II, 13 t I e 13 t II: identificação dos camundongos

Como mostrado na figura 49, após 5 minutos de revelação, apenas para os soros dos camundongos inoculados com o fragmento myo13 cabeça apareceram algumas bandas, mas de tamanho diferente ao da proteína, e para os demais soros não houve o aparecimento de bandas, indicando que os anticorpos eram específicos contra as proteínas presentes na fração inoculada nos camundongos – a proteína recombinante ou proteínas de *E. coli* – e por isso não se ligaram às proteínas presente no extrato proteico de *T. cruzi* e, quando se ligaram, eram proteínas diferentes da proteína de interesse, como observado pela diferença do tamanho.

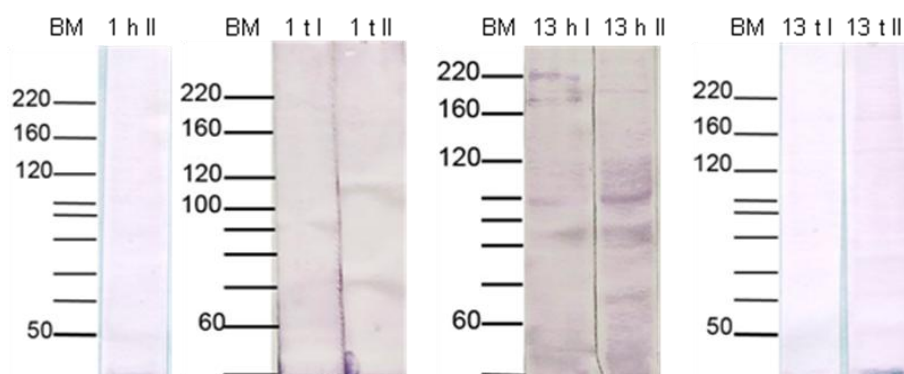


FIGURA 49 – RESULTADO DO *WESTERN BLOT* COMPETITIVO UTILIZANDO O SORO DOS CAMUNDONGOS APÓS A SEXTA INOCULAÇÃO CONTRA O EXTRATO PROTEICO DE *T. cruzi*

NOTA: Os valores à esquerda das figuras representam o tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 1 h II, 1 t I, 1 t II, 13 h I, 13 h II, 13 t I e 13 t II: identificação dos camundongos

Como tentativa de obter uma maior especificidade, o soro 1 h II foi purificado com 80 µg da proteína recombinante purificada imobilizada em membrana de nitrocelulose e 20 µL de extrato de proteínas solúveis de *E. coli* BL21(DE3)pLysS, a fim de se obter apenas os anticorpos específicos para a proteína. Após a purificação, foi realizado um novo *western blot* (FIGURA 50) e o resultado foi semelhante ao observado antes da purificação, significando que a banda de outro tamanho pode ser explicada por reação cruzada com o anticorpo específico contra a proteína recombinante ou degradação/clivagem da proteína específica.

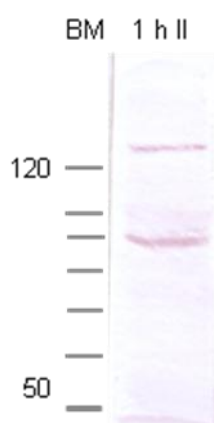


FIGURA 50 – RESULTADO DO *WESTERN BLOT* UTILIZANDO O SORO PURIFICADO DO CAMUNDONGO 1 h II CONTRA O EXTRATO PROTEICO DE *T. cruzi*.

NOTA: Os valores à esquerda das figuras representam o tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 1 h II: identificação do camundongo

Sendo assim, após a avaliação da qualidade de todos os antissoros, optamos por utilizar, para a myo1, os soros 1 h II e 1 t I, pelo fato de ter sido observada uma diferença no padrão do *western blot* com estes dois soros, e para a myo13, o soro 13 t I que mostrou maior especificidade para a proteína.

4.5 IMUNOLOCALIZAÇÃO

Para avaliarmos a localização celular destas miosinas, foram realizados ensaios de imunofluorescência em *T. cruzi* na forma epimastigota em 3 dias de cultivo com os antissoros 1 h II e 1 t I (diluição 1:150) e 13 t I (diluição 1:300). Os resultados estão mostrados nas figuras 51 a (1 h II) e b (1 t I) e 52 (13 t I).

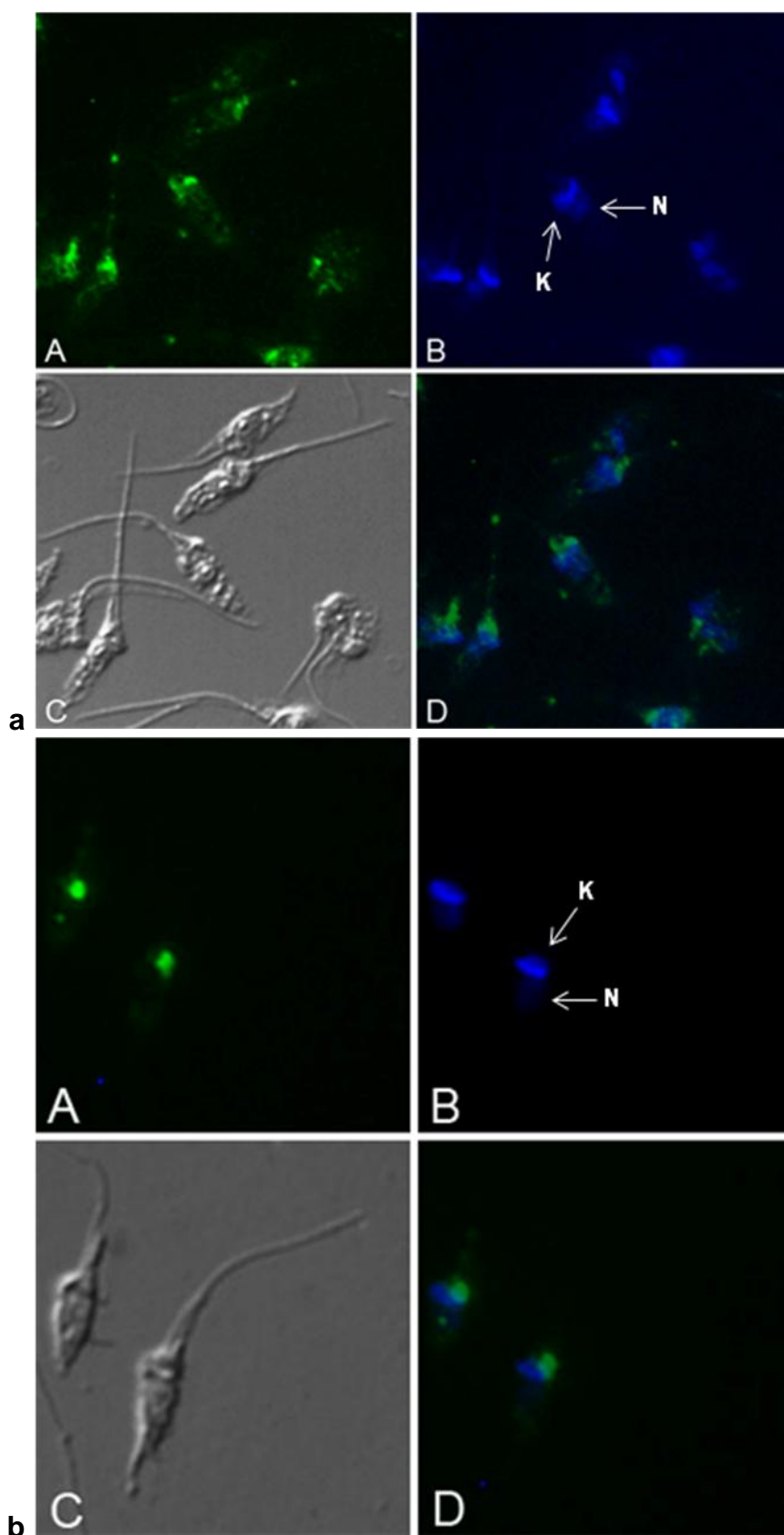


FIGURA 51– RESULTADO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PARASITAS NAS FORMAS EPIMASTIGOTAS UTILIZANDO OS SOROS CONTRA A MYO1

LEGENDA: **a**: soro 1 h II; **b**: soro 1 t I; **A**: incubação com o antissoro específico para a myo1; **B**: marcação de ácidos nucleicos com DAPI; **C**: contraste diferencial de fase; **D**: sobreposição A + B; N: localização do núcleo; K: localização do cinetoplasto

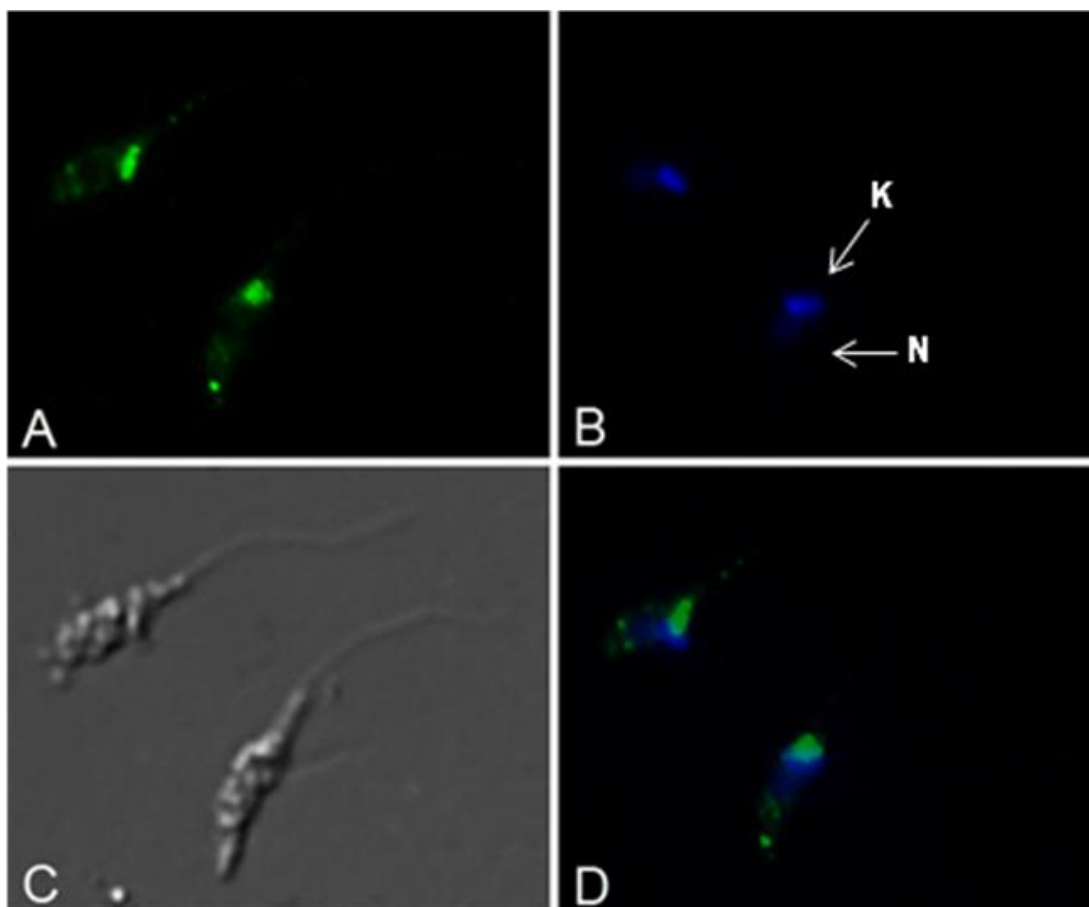


FIGURA 52 – RESULTADO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PARASITAS NAS FORMAS EPIMASTIGOTAS UTILIZANDO O SOROS CONTRA A MYO13

LEGENDA: **A:** incubação com o antissoro específico para a myo13; **B:** marcação de ácidos nucleicos com DAPI; **C:** contraste diferencial de fase; **D:** sobreposição A + B; N: localização do núcleo; K: localização do cinetoplasto

De forma geral, os resultados com os dois soros contra a myo1 se assemelham entre si – mais uma vez evidenciando que os dois soros devem estar específicos – e com o resultado mostrado para a myo1 de *T. brucei*, concentrando-se na região da bolsa flagelar. Já o resultado observado com o antissoro contra a myo13 assemelha-se ao observado com a myo13 de *Leishmania spp*, concentrando-se na base do flagelo. Para confirmar a localização subcelular destas proteínas, será realizado imunocitoquímica com estes antissoros.

Foi realizado, também, imunofluorescência com parasitas na forma tripomastigota metacíclicos, mas não foi observada nenhuma marcação com nenhum destes três antissoros (dados não mostrados).

4.6 PARASITAS TRANSFECTADOS COM VETORES DA PLATAFORMA pTcGW

4.6.1 Vetor pTcGFPN

O vetor pTcGFPN induz a expressão de uma proteína fusionada à GFP na extremidade N-terminal. Parasitas foram transfectados com este vetor contendo os insertos myo1 inteira, myo1 cauda, myo13 inteira e myo13 cauda. Após a seleção dos parasitas contendo o vetor, com o antibiótico apropriado, foram preparados o extrato proteico e lâminas para visualização dos parasitas transfectantes. A verificação da expressão da proteína fusionada à etiqueta de GFP foi realizada através de *western blot* utilizando o antissoro específico e anticorpos anti-GFP (FIGURA 53). Quando utilizamos o antissoro específico, observamos a presença tanto da proteína específica quanto da proteína fusionada com GFP (que aumenta o tamanho da proteína em aproximadamente 30 kDa), quando utilizamos o antissoro específico, observamos a presença da proteína fusionada com GFP, tendo o tamanho esperado de aproximadamente 30 kDa a mais do tamanho da proteína.

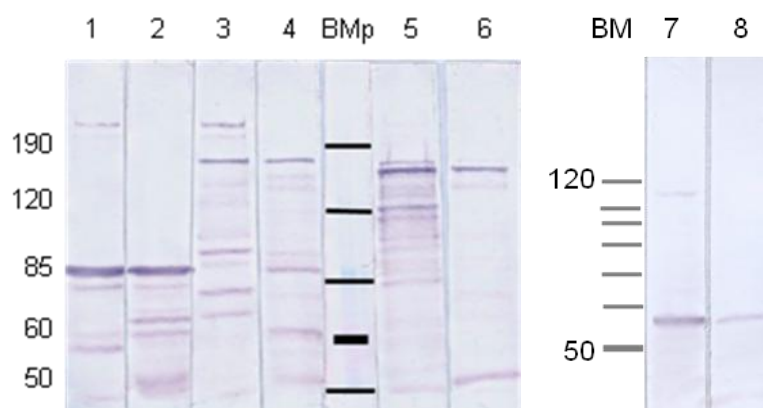


FIGURA 53 – RESULTADO DO *WESTERN BLOT* UTILIZANDO ANTISSOROS ESPECÍFICOS E ANTICORPOS ANTI-GFP

NOTA: Os valores à esquerda do gel correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark™*; BMp: marcador de peso molecular *BenchMark™* pré-corado; 1 e 2: extrato proteico de parasitas transfectados com myo1 cauda-GFP; 3 e 4: extrato proteico de parasitas transfectados com myo1 inteira-GFP; 5 e 6: extrato proteico de parasitas transfectados com myo13 inteira-GFP; 7 e 8: extrato proteico de parasitas transfectados com myo13 cauda-GFP; 1 e 3: incubação com o soro 1 t I, 5 e 7: incubação com o soro 13 t I; 2, 4, 6 e 8: incubação com anti-GFP

Em todas as lâminas, observamos que nem todos os parasitas apresentam fluorescência, indicando que apesar de possuírem o vetor pTcGFPN – pois são

resistentes à droga – não estão expressando a proteína fusionada à GFP.

A figura 54 mostra parasitas transfectados com o vetor contendo o inserto da *myo1* inteira e observamos que a proteína fluorescente está dispersa por toda a célula.

A figura 55 mostra os parasitas transfectados com o vetor contendo o inserto *myo1* cauda e observa-se que, apesar da proteína também estar fracamente dispersa por toda a célula, há uma concentração relativamente maior na região próxima ao cinetoplasto, o que corrobora com o observado na imunofluorescência.

Na figura 56 estão os parasitas transfectados com o vetor contendo o inserto da *myo13* inteira, e observa-se que, de forma semelhante ao observado com a *myo1*, a fluorescência está dispersa por toda a célula.

A figura 57 mostra os parasitas transfectados com o vetor contendo o inserto *myo13* cauda e a fluorescência está fracamente dispersa por toda a célula. A fim de confirmar este resultado, uma nova transfecção será realizada.

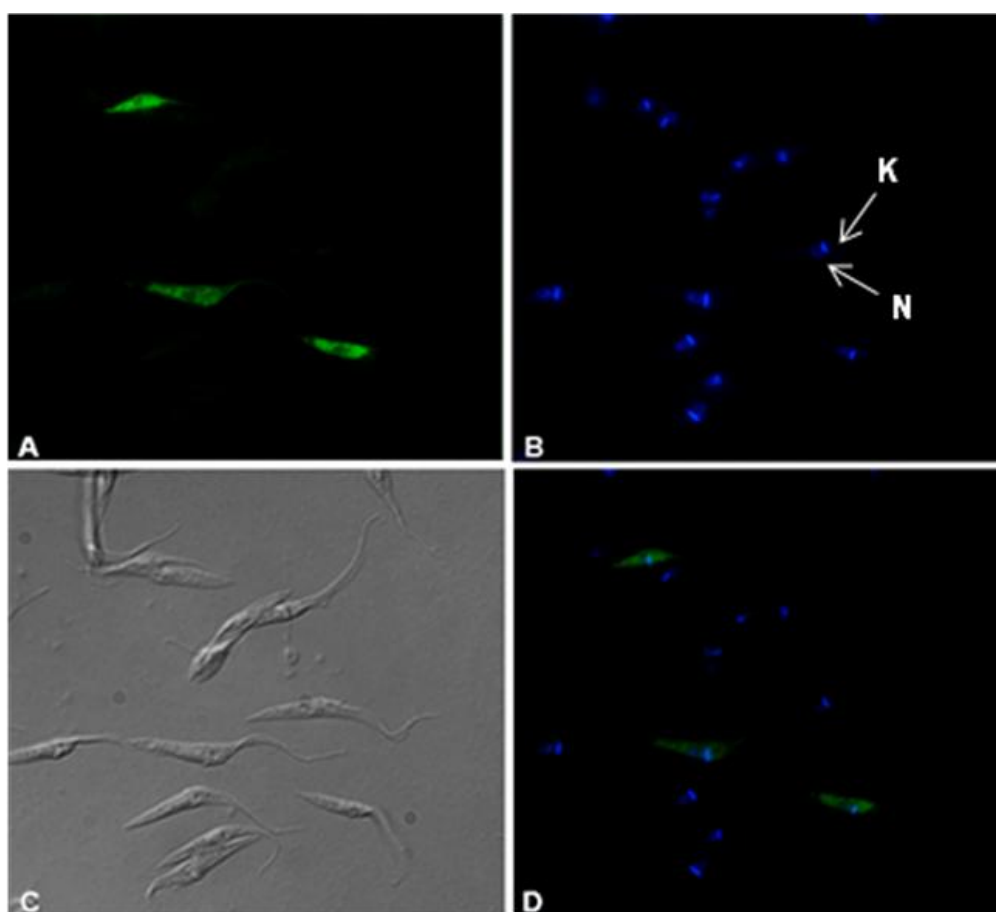


FIGURA 54 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DO GENE DA MYO1 INTEIRA

LEGENDA: **A:** visualização da fluorescência emitida pelo GFP; **B:** marcação de ácidos nucleicos com DAPI; **C:** contraste diferencial de fase; **D:** sobreposição A + B; N: localização do núcleo; K: localização do cinetoplasto

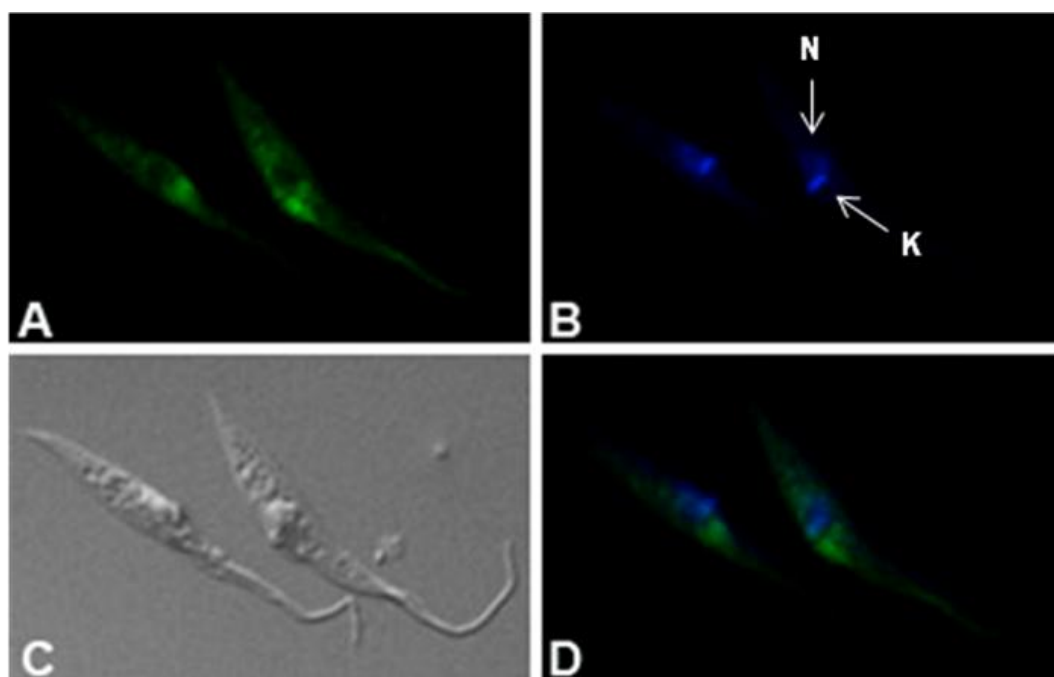


FIGURA 55 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DA CAUDA DA MYO1

LEGENDA: **A**: visualização da fluorescência emitida pelo GFP; **B**: marcação de ácidos nucleicos com DAPI; **C**: contraste diferencial de fase; **D**: sobreposição A + B; N: localização do núcleo; K: localização do cinetoplasto

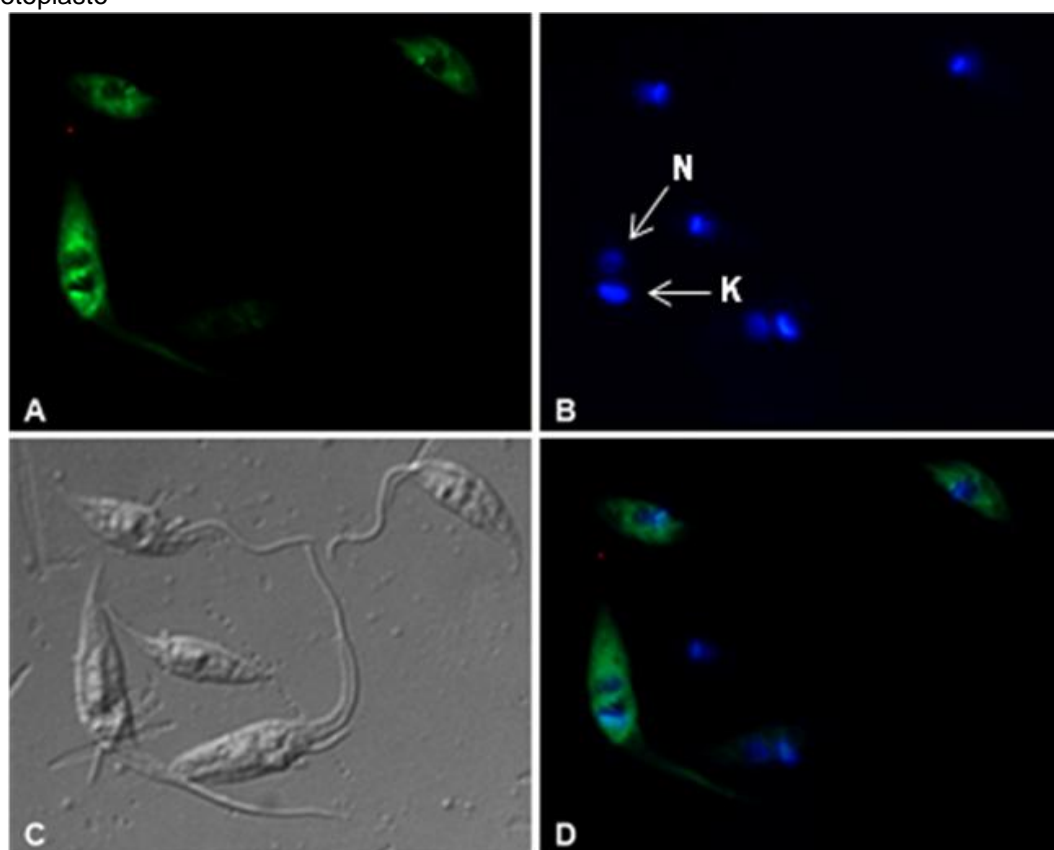


FIGURA 56 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DO GENE DA MYO13 INTEIRA

LEGENDA: **A**: visualização da fluorescência emitida pela GFP; **B**: marcação com DAPI; **C**: contraste diferencial de fase; **D**: sobreposição A + B; N: localização do núcleo; K: localização do cinetoplasto

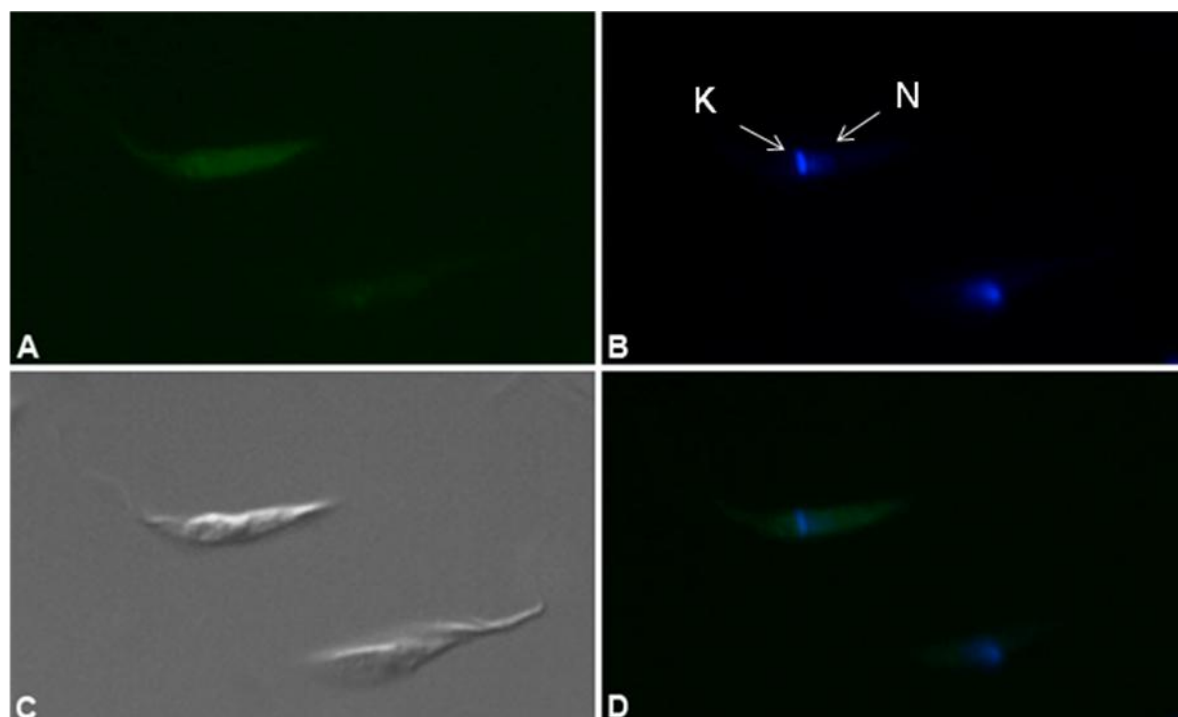


FIGURA 57 – PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcGFPN CONTENDO O INSERTO DA CAUDA DA MYO13

LEGENDA: **A:** visualização da fluorescência emitida pela GFP; **B:** marcação com DAPI; **C:** contraste diferencial de fase; **D:** sobreposição A + B; N: localização do núcleo; K: localização do cinetoplasto

Com a superexpressão das caudas das miosinas, como observado na figura 53, esperávamos obter um efeito dominante negativo, em que a carga se ligaria preferencialmente às caudas não funcionais, impedindo a atuação das miosinas nativas nas células. No entanto, não foi observado nenhuma alteração morfológica e nem na taxa de crescimento dos parasitas.

4.6.2 Vetor pTcMYC

A diferença na localização da myo1 quando comparados os resultados da imunolocalização com o resultado dos parasitas expressando a proteína fusionada à etiqueta de GFP levantou a hipótese de que a etiqueta de GFP poderia estar interferindo com o correto enovelamento da proteína, pelo fato de ser uma etiqueta relativamente grande e estar na extremidade N-terminal. Como uma alternativa para ver a localização da proteína, parasitas foram transfectados contendo o inserto myo1 inteira no vetor pTcMYCN para expressão da proteína fusionada à etiqueta *c-myc* – um peptídeo de 12 aminoácidos – na região N-terminal. Os parasitas selecionados

foram utilizados para um ensaio de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-c-*myc* e, conforme observado na figura 58, o padrão permaneceu bastante semelhante ao resultado obtido com o vetor pTcGFPN e, por isso, não foi realizada a transfecção com o vetor contendo o inserto da *myo13*.

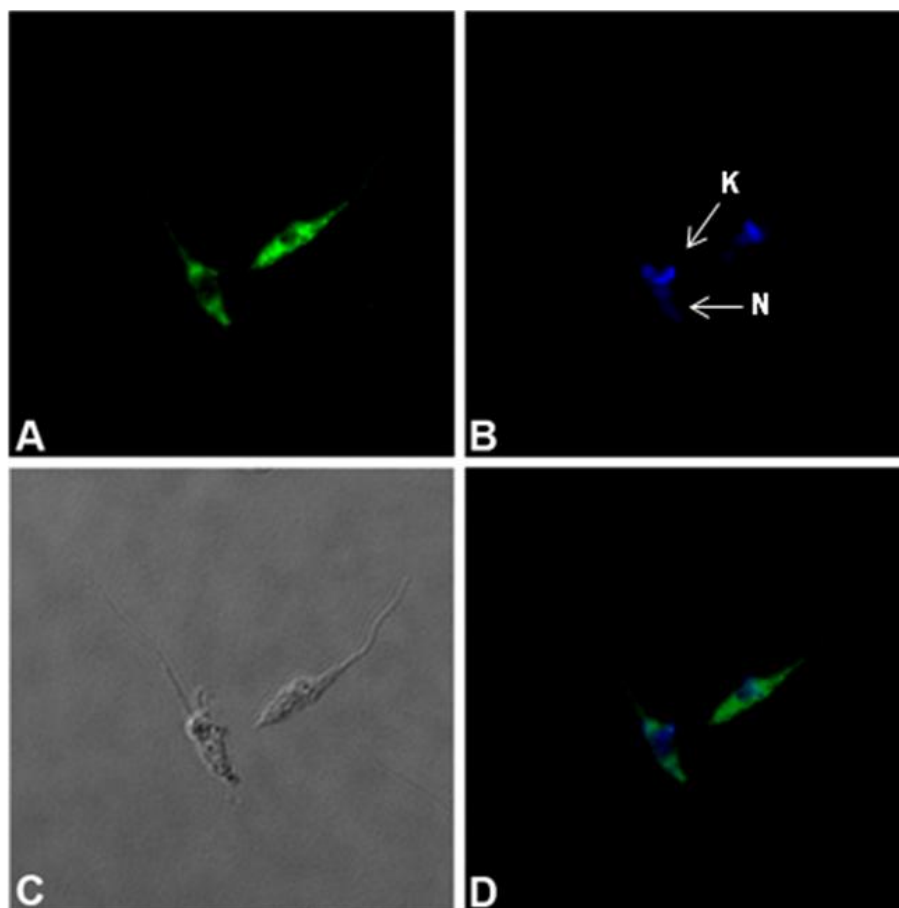


FIGURA 58 – IMUNOFLUORESCÊNCIA DE PARASITAS TRANSFECTADOS COM O VETOR pTcMYCN CONTENDO O INSERTO DO GENE DA MYO1 INTEIRA

LEGENDA: **A:** visualização da imunofluorescência utilizando anticorpo anti-myc; **B:** marcação de ácidos nucleicos com DAPI; **C:** contraste diferencial de fase; **D:** sobreposição A + B; N: localização do núcleo; K: localização do cinetoplasto

4.7 ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

Para uma análise dos antissoros, primeiramente foi realizado um ensaio de imunoprecipitação com os dois antissoros contra a *myo1* (1 h II e 1 t I) utilizando o extrato de proteínas desnaturadas a fim de se obter apenas as mesmas proteínas que aparecem no *western blot* (vide item 4.4.2.1). Assim, com estas proteínas purificadas a partir de uma separação eletroforética SDS-PAGE, seria possível

identificá-las e então obter uma resposta do que são estes outros peptídeos reconhecidos pelos antissoros contra a myo1. Durante este ensaio, foram armazenadas alíquotas do extrato total na mesma diluição utilizada para a imunoprecipitação, fração de proteínas não ligadas, lavados 1 e 4, fração eluída e resina, e esse foram aplicados em um gel de poliacrilamida para eletroforese SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e foi realizado *western blot* com os mesmos antissoros utilizados na imunoprecipitação. Neste resultado, esperávamos observar a presença das mesmas bandas na fração eluída, mas não apareceu nenhuma proteína nesta fração (FIGURA 59). Como a proteína não estava sendo reconhecida nem mesmo na fração do extrato total, foram preparados novos extratos e foi realizado um *western blot* com extratos proteicos obtidos por três métodos: extrato total para eletroforese (lise realizada com tampão de amostra para SDS-PAGE), e extratos desnaturado e nativo para imunoprecipitação; todos com quantidade proveniente de aproximadamente 10^7 células, com diluição 1:250 e revelação durante 10 minutos. Pelofato de que as três preparações são para a obtenção do extrato proteico total, esperava-se obter o mesmo resultado em todos, mas, como observado na figura 60, o resultado observado no extrato obtido a partir da lise realizada com tampão de amostra para SDS-PAGE não se repetiu nos outros dois extratos, cujas bandas apareceram com uma intensidade menor. Para contornar esta situação, poderíamos ter realizado outro ensaio de imunoprecipitação com maior quantidade tanto de extrato proteico como de antissoro, mas não possuímos antissoro suficiente e, por isso não foi realizado.

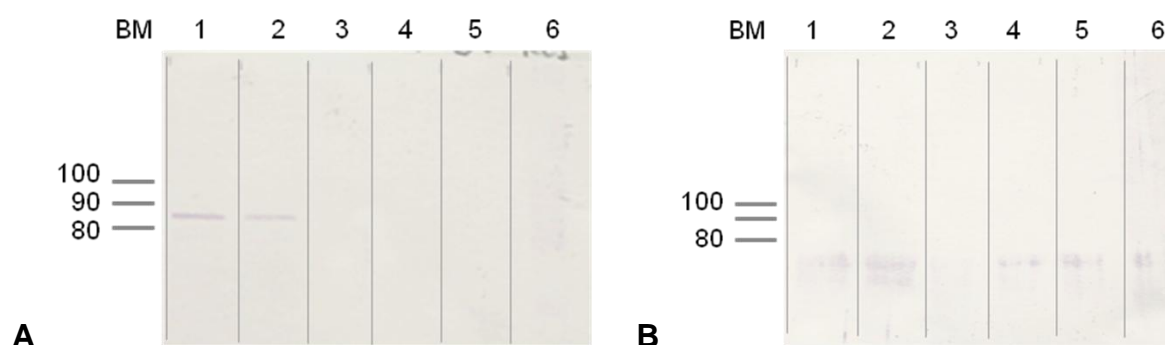


FIGURA 59 – RESULTADOS DE *WESTERN BLOT* DE FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE O ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

NOTA: Os valores à esquerda das membranas correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A**: imunoprecipitação realizada com o antissoro 1 h II; **B**: imunoprecipitação realizada com o antissoro 1 t I; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 1: extrato de proteínas; 2: fração de proteínas não ligadas; 3: primeira lavagem; 4: quarta lavagem; 5: fração eluída; 6: resina

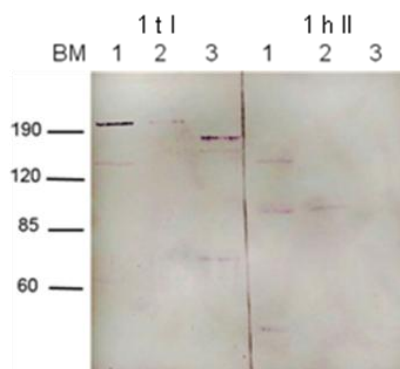


FIGURA 60 – RESULTADOS DE *WESTERN BLOT* CONTRA EXTRATO PROTEICO DE *T. cruzi* OBTIDO POR DIFERENTES MÉTODOS

NOTA: Os valores à esquerda das membranas correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: BM: marcador de peso molecular *BenchMark™* pré-corado; 1 t I: membrana incubada com o soro 1 t I; 1 h II: membrana incubada com o soro 1 h II; 1: extrato total para eletroforese; 2: extrato obtido com lise desnaturante para imunoprecipitação; 3: extrato obtido com lise nativa para imunoprecipitação

Este problema também nos impediu que fosse realizado um ensaio de imunoprecipitação com o extrato nativo para a obtenção de complexos proteicos relacionados à miosina. Uma alternativa para a obtenção destes complexos foi a realização de imunoprecipitação utilizando o extrato nativo de *T. cruzi* transfectado com a cauda da myo1 fusionada à GFP com o anticorpo anti-GFP. Pelo fato de que a cauda fusionada à GFP se localiza na mesma região celular da proteína nativa observado pelo ensaio de imunofluorescência, imagina-se que a cauda esteja interagindo com as mesmas proteínas da proteína nativa e assim poderíamos identificar estas proteínas. A figura 61 A mostra o *western blot* realizado com os extratos de transfectantes expressando tanto a myo1 inteira como a cauda da myo1 fusionadas à GFP utilizando o anticorpo anti-GFP diluído 1:2000 revelado durante 3 minutos e observamos a presença das proteínas com os tamanhos esperados (aproximadamente 80 kDa para a cauda fusionada à GFP e aproximadamente 160 kDa para a inteira fusionada à GFP). No entanto, observamos também a presença de diversas outras proteínas menores. Para verificar se estas proteínas menores são devido a ligações cruzadas do anticorpo anti-GFP com outras proteínas de *T. cruzi* ou se são degradação das próprias miosinas, foi realizado um *western blot* com gel de poliacrilamida 13% contendo o extrato de *T. cruzi* selvagem com o anticorpo anti-GFP na mesma diluição (1:2000) e revelado durante o mesmo tempo (3 minutos), e novamente observamos o aparecimento de diversas bandas (FIGURA 61 B), indicando que este anticorpo está se ligando à diversas proteínas de *T. cruzi*, impossibilitando a realização da imunoprecipitação com este anticorpo.

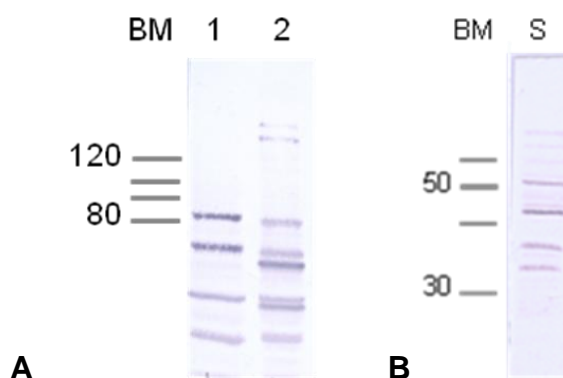


FIGURA 61 – RESULTADOS DE *WESTERN BLOT* COM EXTRATOS DE PARASITAS TRANSFECTANTES E SELVAGEM UTILIZANDO ANTICORPO ANTI-GFP

NOTA: Os valores à esquerda das membranas correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: **A:** extrato de parasitas transfectantes; **B:** extrato de parasitas selvagem; BM: marcador de peso molecular *BenchMark*TM; 1: extrato de parasitas transfectados expressando a cauda da myo1 fusionada à GFP; 2: extrato de parasitas transfectados expressando a myo1 fusionada à GFP; S: extrato de parasitas selvagem

Outra alternativa utilizada foi a obtenção dos complexos proteicos utilizando-se o vetor pTcPTP. A CDS da myo1 inteira foi inserida neste vetor que foi transfectado em *T. cruzi*. Tentou-se clonar também a CDS da myo13 inteira, mas não obtivemos sucesso na clonagem. Assim, parasitas transfectados com este vetor foram utilizados no ensaio de imunoprecipitação com anticorpos anti-proteína C, como descrito em 3.20.3. Como controle, foi realizado o mesmo ensaio com parasitas selvagem. A fração eluída foi concentrada com acetato de amônio e foi toda aplicada em gel de poliacrilamida. Foi aplicado também uma alíquota do extrato de proteínas não ligado. Após ter sido submetido à eletroforese em SDS-PAGE, o gel foi corado com nitrato de prata, onde observamos alguns contaminantes presentes tanto no controle selvagem como no transfectante. Mas existem algumas proteínas presentes apenas no transfectante, indicando que possa ser a miosina e alguns complexos (FIGURA 62).

4.8 NOCAUTE GÊNICO

Para a realização do nocaute, primeiramente foram amplificadas as regiões *UP* e *DOWN* (ver Material e Métodos) de cada gene, e os cassetes contendo o gene de resistência. Os tamanhos de cada região intergênica, assim como os tamanhos

após a fusão com o cassete com resistência à neomicina (1650 pb) e com o cassete com resistência à higromicina (1850 pb) estão mostrados na tabela 6.

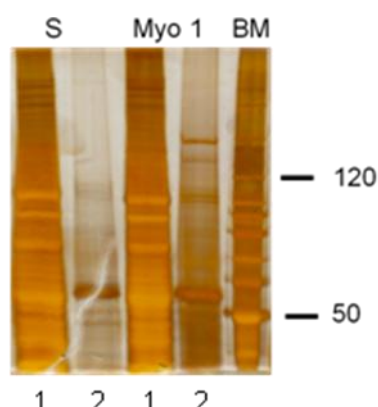


FIGURA 62 – GEL DE POLIACRILAMIDA DA IMUNOPRECIPITAÇÃO COM O VETOR pTcPTP

NOTA: Os valores à direita do gel correspondem ao tamanho dos fragmentos em kDa.

LEGENDA: S: parasitas selvagem; Myo1: parasitas transfectados com a myo1 no vetor pTcPTP; BM: marcador de peso molecular *BenchMark™*; 1: extrato de proteínas não ligadas; 2: fração eluída

As regiões intergênicas a 5' e 3' do gene da myo1 foram amplificadas a partir do DNA genômico utilizando a enzima *Platinum® Taq* DNA polimerase *High Fidelity*, com 50°C de temperatura de anelamento e 45 segundos de tempo de extensão (FIGURA 63 A). As regiões intergênicas a 5' e 3' da myo13 foram amplificadas a partir do DNA genômico utilizando a enzima *Platinum® Taq* DNA polimerase *High Fidelity*, com 55°C de temperatura de anelamento e 1 minuto de tempo de extensão (FIGURA 63 B). No entanto, ainda não conseguimos amplificar com sucesso a região a 5' da myo13. Os cassetes contendo o gene para resistência a neomicina e higromicina flanqueados pelas regiões intergênicas entre os genes da Enolase e Kap3 a 5' e a região intergênica entre cópias do gene GAPDH a 3' foram amplificados a partir dos plasmídeos pNeo2 e pHig2, respectivamente, utilizando a enzima *Platinum® Taq* DNA polimerase *High Fidelity*, com 50°C de temperatura de anelamento e 2 minutos de tempo de extensão (FIGURA 63 C). As PCRs foram purificadas utilizando o kit de purificação *High Pure*, seguindo as informações do fabricante, e o foram eluídas no dobro do volume de PCR inicial.

TABELA 6 – TAMANHOS DAS REGIÕES INTERGÊNICAS E DOS CASSETES APÓS A FUSÃO COM OS CASSETES DE RESISTÊNCIA À NEOMICINA E À HIGROMICINA EM PARES DE BASES

Miosina	Região	Tamanho	UP + neo + DOWN	UP + hig + DOWN
Myo1	UP	1072	2962	3162
	DOWN	240		
Myo13	UP	555	2738	2938
	DOWN	533		

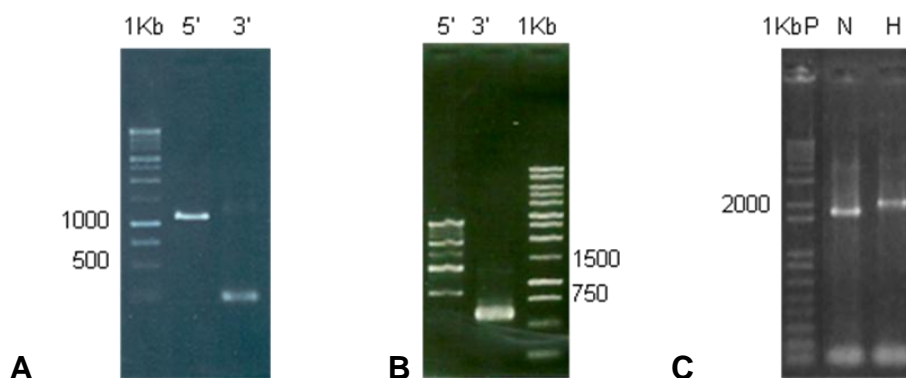


FIGURA 63 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS AMPLIFICAÇÕES DAS REGIÕES INTERGÊNICAS E DOS CASSETES CONTENDO OS GENES PARA RESISTÊNCIA À NEOMICINA E À HIGROMICINA

NOTA: Os valores à esquerda ou à direita dos géis correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases.

LEGENDA: **A:** amplificações das regiões intergênica do gene da *myo1*; **B:** amplificações das regiões intergênica do gene *myo13* **C:** amplificações dos cassetes de resistência; 1Kb: marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; 5': região *UP*; 3': região *DOWN*; 1KbP: marcador de peso molecular 1 Kb Plus; N: cassette com o gene de resistência à neomicina; H: cassette com o gene de resistência à higromicina

A PCR de fusão foi realizada utilizando as reações de PCR purificadas das regiões *UP* e *DOWN* do gene da *myo1* e o cassette de resistência para neomicina utilizando os oligonucleotídeos *forward* da região intergênica a 5' e *reverse* da região intergênica a 3'. Para a realização da PCR de fusão, quatro condições de PCR foram testadas: com duas diferentes quantidades de DNA (0,5 e 1 µl do volume de PCR purificada de cada segmento) e com duas diferentes quantidades de oligonucleotídeos (0,25 e 0,5 pmol de cada oligonucleotídeo), todas utilizando a enzima *Platinum® Taq DNA polimerase High Fidelity* em volume final de 25 µl com 55°C de temperatura de anelamento e 3,5 minutos de tempo de extensão. O resultado (FIGURA 64) mostrou que a melhor condição foi utilizando 1 µl de cada reação de PCR purificada e 0,5 pmol de cada oligonucleotídeo.

Para obter uma maior quantidade de produto de PCR, necessária para a realização da transfecção, foi realizada uma nova PCR com as mesmas condições da PCR número em volume final de 100 µl, mas não houve o aparecimento de nenhuma banda no gel de agarose.

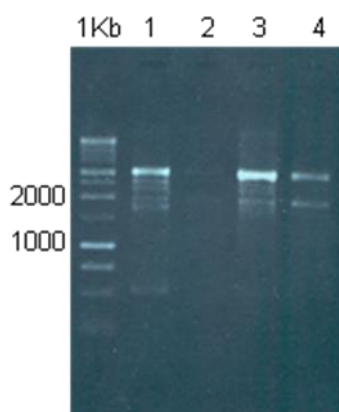


FIGURA 64 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR DE FUSÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DO GENE MYO1 COM O CASSETTE CONTENDO O GENE PARA RESISTÊNCIA A NEOMICINA.

NOTA: Os valores à esquerda do gel correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de bases.
 LEGENDA: 1Kb: marcador de peso molecular 1 Kb DNA *Ladder*; 1: PCR feita com 0,5 µl de cada reação de PCR e 0,5 pmol de cada oligonucleotídeo; 2: PCR feita com 0,5 µl de cada reação de PCR e 0,25 pmol de cada oligonucleotídeo; 3: PCR feita com 1 µl de cada reação de PCR e 0,5 pmol de cada oligonucleotídeo; 4: PCR feita com 1 µl de cada reação de PCR e 0,25 pmol de cada oligonucleotídeo

Como segunda tentativa, foi realizada PCR da PCR de fusão com a enzima *Platinum® Taq* DNA polimerase *High Fidelity* em volume final de 25 µl, com 55°C de temperatura de anelamento e 3,5 minutos de extensão. Como DNA-molde, foi utilizado 1 µl da PCR de fusão diluída 100 vezes. No entanto, como observado na figura 65, o padrão de amplificação desta PCR não foi o mesmo da PCR de fusão.

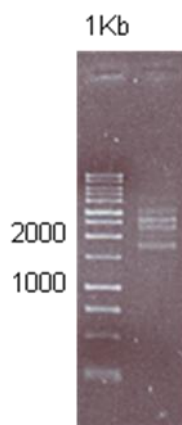


FIGURA 65 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR DA PCR DE FUSÃO

NOTA: Os valores à esquerda do gel correspondem ao tamanho dos fragmentos em pares de base.
 LEGENDA: 1Kb: 1 Kb DNA *Ladder*

Até o momento, não foi possível obter o cassete para transfecção em grande quantidade, mas novas tentativas serão realizadas.

4.9 INTERFERÊNCIA POR RNA EM *T. brucei*

As duas sequências para a myo1 e as duas sequências para a myo13 foram amplificadas e inseridas com sucesso no vetor p2T7-177/*lacZ*, que foram linearizados e transfectados em *T. brucei*. No entanto, não houve seleção de parasitas resistentes. Como foi publicado um trabalho que fez RNAi das miosinas de *T. brucei*, achamos desnecessário investir em um experimento repetido, e estes ensaios foram abandonados.

5 DISCUSSÃO

As miosinas constituem uma das maiores famílias de proteínas em eucariotos e realizam atividades essenciais às células, como tráfego intracelular, locomoção e citocinese. Até o momento, apenas três organismos cujos genomas foram sequenciados não possuem gene para miosina: a alga vermelha unicelular *Cyanidioschyzon merolae* e os protozoários *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007).

A vasta distribuição taxonômica das miosinas, somada às diferentes e vitais funções que elas exercem, justifica a importância de estudá-las, principalmente em organismos patogênicos, que é o caso do *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos. No entanto, o *T. cruzi* difere dos demais tripanossomatídeos pelo fato de possuir nove miosinas, sendo 7 órfãs, enquanto os outros possuem apenas duas – a myo1 e a myo13, compartilhadas entre todos os tripanossomatídeos cujos genomas foram sequenciados até o momento (ODRONITZ e KOLLMAR, 2007).

Os cinetoplastídeos (classe Kinetoplastida, que engloba a família Tripanosomatidae), juntamente com os euglenídeos, que compõem o grupo Euglenozoa, são organismos que divergiram muito cedo na escala evolutiva dos demais eucariotos (revisto por HANNAERT *et al.* em 2003) e possuem diversas peculiaridades, dentre elas: a compartimentalização metabólica de parte da via glicolítica em organelas conhecidas como glicossomos; a transcrição policistrônica de genes não relacionados entre si e *trans*-splicing, no qual é adicionado uma mesma sequência (a sequência líder) a todos os transcritos de mRNA; a presença de uma única mitocôndria diferenciada com o DNA mitocondrial concentrado na região do cinetoplasto; e o processo de edição que ocorre no RNA mitocondrial, (recentemente revistos por HANNAERT *et al.* em 2003; CAMPBELL *et al.*, 2003; SIMPSON *et al.*, 2004; LUKES *et al.*, 2005; SIMPSON *et al.*, 2006).

Em tripanossomatídeos, a organização celular, assim como o citoesqueleto, também difere da observada em eucariotos superiores. Os filamentos de actina, estrutura importante tanto para a manutenção da forma celular como para servir de trilho para o transporte intracelular realizado pelas miosinas, ainda não foram observados em tripanossomatídeos, apesar de existirem evidências da sua presença nestes organismos, como mostrado em trabalhos realizados com *T. cruzi*,

T. brucei e *Leishmania spp.*, mesmo que apenas por um curto período de tempo.

Em *T. cruzi*, foi mostrada a presença de proteínas de ligação à actina que são teoricamente suficientes para conduzirem a montagem e desmontagem dos filamentos de actina (DE MELO *et al.*, 2008). Foi também mostrado que há uma variação da localização de actina nas diferentes fases do ciclo de vida: fracamente dispersa por toda a célula tripomastigota, heterogênea na célula amastigota e presente em toda a célula epimastigota, mas com uma maior concentração na base do flagelo e em porções ao longo do flagelo (CEVALLOS *et al.*, 2011).

Em *T. brucei*, foi mostrado por García-Salcedo e cols. (2004) que a perda de actina por RNAi cessou a endocitose, causou imediata interrupção da divisão celular, alterações na morfologia e morte celular depois de no máximo três dias após a indução do RNAi nas formas sanguíneas, e não teve nenhum efeito nas formas procíclicas. Utilizando anticorpos produzidos contra actina recombinante de *T. brucei*, eles mostraram que enquanto que nas formas procíclicas a actina encontra-se uniformemente dispersa por toda a célula, nas formas sanguíneas a actina se concentra na região entre núcleo e cinetoplasto, o local do caminho endocítico nestes parasitas. Assim, acredita-se que a actina esteja envolvida com a endocitose de *T. brucei* na forma sanguínea via bolsa flagelar.

Em 2010, Spitznagel e cols. caracterizaram a miosina de classe I de *T. brucei* e obtiveram resultados semelhantes ao observado com os estudos realizados com a actina, tanto para a localização como para os efeitos observados após a indução de RNAi. Eles também investigaram a localização da miosina em parasitas que tiveram o citoesqueleto de actina interrompido por RNAi da actina ou pelo uso de latrunculina A, um agente que se liga à forma monomérica da actina e desfaz os filamentos. Em ambos os casos, a distribuição da myo1 não se alterou nas formas procíclicas e tornou-se difusa nas formas sanguíneas, mostrando que a distribuição da myo1 nas formas sanguíneas é dependente de actina, enquanto que o efeito da latrunculina foi consistente com uma interação com a forma filamentosa de actina. Esses resultados mostraram que a myo1 juntamente com filamentos de actina é necessária para a atividade endocítica nas formas sanguíneas de *T. brucei*.

As miosinas de *Leishmania spp.* foram estudadas por Katta e cols. em 2009. No entanto, após a produção de anticorpos contra a myo1 de *L. major*, não foi detectado a presença desta miosina no extrato proteico dos parasitas. Por outro lado, a myo13 foi detectada em extratos de *L. donovani*, *L. major* e *L. tropica*. A

imunofluorescência de parasitas com anticorpos anti-actina e anti-myo13 mostrou que, enquanto a actina está distribuída por toda a célula, a myo13 está concentrada na região proximal do flagelo, apesar de estar distribuída de forma esparsa por toda a célula. Este resultado se manteve quando foram observadas células transfectadas com o gene para a myo13 inteira clonada no vetor para expressão da proteína fusionada à etiqueta de GFP na extremidade C-terminal. Interessantemente, a expressão apenas da região da cabeça de miosina fusionada à etiqueta de GFP na extremidade C-terminal ficou espalhada por toda a célula, enquanto que a expressão apenas da região da cauda de miosina fusionada à etiqueta de GFP na extremidade N-terminal também se concentrou na região proximal do flagelo, sugerindo que a localização da myo13 na região flagelar é dependente apenas do domínio da cauda. Ainda não há estudos publicados da miosina de classe XIII de *T. brucei*.

Assim, vimos que tanto a localização de actina como a de miosina variaram nas diferentes fases do ciclo de vida de *T. brucei*, assim como a localização de actina em *T. cruzi*. Em *T. brucei* e em *L. donovani* foi mostrada a associação que ocorre entre miosina e actina. Também foi observado que essas miosinas de classes diferentes (myo1 de *T. brucei* e myo13 de *L. donovani*) compartilham algumas funções, como participação na endocitose e tráfego de vesículas.

Ainda não se tem nenhum trabalho com relação às miosinas de *T. cruzi*. Estudos com espectrometria de massas realizados pelo nosso grupo avaliaram a proteômica total do *T. cruzi* e mostraram que, apesar de possuir genes para nove miosinas distintas, apenas a myo13 foi detectada (MARCHINI, em preparação), sugerindo que as demais miosinas sejam expressas em pequenas quantidades ou em apenas determinados momentos durante o ciclo de vida. Já em estudos utilizando a plataforma SOLiD™ de sequenciamento em larga escala, o transcriptoma total de *T. cruzi* foi sequenciado e foi detectada a presença de RNAs para todas as nove miosinas, mas, com exceção da myo13, foi obtido um baixo número de *reads* (PROBST, em preparação), novamente sugerindo uma baixa expressão destas proteínas.

Sendo assim, os resultados observados no *western blot* com os antissoros dos camundongos inoculados com a myo1 não são surpreendentes. A princípio, desconfiamos que os anticorpos presentes no antissoro dos camundongos estavam se ligando a outras proteínas do extrato, e assim o antissoro não era específico e não poderia ser utilizado nos demais imunoenaios. No entanto, a atual hipótese é

que foram produzidos anticorpos contra a proteína recombinante, mas estes anticorpos reagiram fracamente contra o extrato de *T. cruzi* pelo fato de haver pouca quantidade desta proteína no extrato, o que pode explicar a presença de outras bandas no *western blot*, que não apareceram quando foi realizado *western blot* competitivo. Um resultado semelhante foi observado no *western blot* com antissoro contra a myo1 de *T. brucei*, no trabalho onde Spitznagel e cols. caracterizaram esta miosina (2010). Além disso, no trabalho em que Katta e cols. (2009) caracterizaram a myo13 de *Leishmania*, eles comentaram que produziram anticorpos também contra a myo1, mas não houve reconhecimento da proteína através de *western blot*, e assim eles concluíram que a myo1 não é expressa em *Leishmania*.

O fato de esta proteína ser pouco expressa também dificultou a realização de imunoprecipitação utilizando os antissoros produzidos contra a Myo1, que teria sido importante para a identificação das proteínas de outros tamanhos reconhecidas pelos anticorpos presentes nos antissoros, que parecem ser específicas para os anticorpos produzidos contra a proteína recombinante inoculada pelo resultado obtido no *western blot* com competição. Pretendia-se realizar uma imunoprecipitação utilizando os antissoros produzidos tanto contra a cabeça como contra a cauda da myo1 com extratos proteicos de *T. cruzi* obtidos por lise com tampão desnaturante. Assim, esperava-se que os anticorpos se ligariam às mesmas proteínas que aparecem no *western blot*, e estas proteínas seriam então identificadas por espectrometria de massas, o que nos responderia se as bandas não esperadas reconhecidas por estes soros são, ou não, degradação da miosina ou algum tipo de complexo. Mas como a reação dos anticorpos foi muito baixa, como observado no *western blot* realizado com os antissoros contra este extrato, esse ensaio não foi possível de ser realizado. No entanto, apesar de ainda não ter sido feito, este ensaio não foi descartado e estamos procurando alternativas para poder realizá-lo.

Os resultados para a localização por imunofluorescência foram semelhantes aos publicados para *T. brucei* e *Leishmania* – próximo ao cinetoplasto, podendo ser a bolsa flagelar, e a base do flagelo. Para confirmar a localização subcelular, serão realizados ensaios de imunocitoquímica em microscópio eletrônico de transmissão. No entanto, essa localização sugere que, assim como para *T. brucei* e *Leishmania*, as miosinas de classe I e XIII de *T. cruzi* devem ter participação na endocitose que ocorre na região da bolsa flagelar e no tráfego de vesículas. Assim que obtivermos a identificação de complexos proteicos ligados às miosinas e parasitas nocaute para

estas duas miosinas, poderemos fazer uma análise funcional das miosinas de classe I e XIII de *T. cruzi*.

Diferentemente do que foi observado no trabalho com miosinas de *Leishmania spp.*, nossos resultados com parasitas mutantes expressando as miosinas fusionadas à etiqueta de GFP não se mantiveram os mesmos do observado na imunofluorescência. Em *L. donovani*, tanto nos ensaios de imunofluorescência como com parasitas expressando a miosina fusionada à etiqueta de GFP, a localização observada foi na base do flagelo. E neste trabalho, enquanto que os resultados das imunofluorescências mostraram a localização das miosinas próximas do cinetoplasto e da base do flagelo, em parasitas expressando as miosinas fusionadas à etiqueta de GFP, a localização se mostrou dispersa por toda a célula. A diferença na construção foi que, enquanto no trabalho de *Leishmania* a GFP foi fusionada na extremidade C-terminal, aqui foi utilizada a construção com fusão da GFP na extremidade N-terminal. Foi utilizado o vetor pTcGFPN (BATISTA *et al.*, 2010) por ter sido desenvolvido em nosso laboratório para ser usado na plataforma Gateway®, facilitando a obtenção destes clones, visto que os insertos já estavam clonados em vetores de entrada desta plataforma. O vetor pTcGFPC, que insere a etiqueta de GFP na extremidade C-terminal, está sendo desenvolvido e, assim que estiver disponível, será utilizado para a continuidade deste trabalho.

Batista e cols. (2010) demonstraram que a localização de determinadas proteínas se mantiveram as mesmas quando foram clonadas no vetor pTcGFPN, validando a eficiência do vetor. Mas como cada proteína tem suas determinadas características, essa informação não pode ser tomada como verdadeira para todas as proteínas e, no caso das miosinas, a extremidade N-terminal tem uma grande importância tanto na sua estrutura como na função, visto que é uma região globular de ligação ao filamento de actina. Assim, uma etiqueta em sua extremidade N-terminal pode acabar interferindo no dobramento correto desta proteína e, conseqüentemente, alterando sua função e localização, como também apenas estericamente impedindo a ligação com a actina.

Nos resultados de Katta e cols. (2009), eles clonaram também apenas a região da cauda da miosina de *Leishmania* no vetor para fusão da GFP na extremidade N-terminal e foi observada a mesma localização da proteína tanto quando comparada com a miosina inteira fusionada à GFP (C-terminal) como quando comparado ao observado em ensaios de imunofluorescência. Assim,

podemos concluir que a região da cauda da miosina não sofreu alterações conformacionais quando fusionada à GFP na extremidade N-terminal e se manteve ligada aos mesmos complexos das caudas das miosinas nativas. Observando os nossos resultados para a myo1, vimos que a cauda fusionada à GFP se manteve concentrada na mesma região do observado por imunofluorescência e, portanto, pode estar interagindo com os mesmos complexos proteicos da myo1 nativa. Esta localização sugere que é a carga que define a localização da miosina naquela região.

Além de contribuir para a localização, a superexpressão da cauda da miosina, proporcionada pelo vetor pTcGFPN, poderia causar um efeito dominante-negativo, no qual estas proteínas mutantes não funcionais atrapalhariam a atuação da miosina nativa, pois a carga estaria associada preferencialmente à cauda mutante devido à superexpressão mas, aparentemente, não foi observada nenhuma alteração, nem neste trabalho e nem no realizado por Katta e cols (2009). Uma possível explicação seria redundância na função das miosinas, em que uma ou mais das outras miosinas estariam ligadas às mesmas cargas e continuariam exercendo sua função.

Para a myo13 de *T. cruzi*, células expressando apenas a região da cauda fusionada à etiqueta de GFP mostraram uma distribuição difusa da proteína por toda a célula, enquanto que o resultado da imunofluorescência mostra uma concentração da proteína na base do flagelo. Como não obtivemos boas imagens destes transfectantes, uma nova transfecção será realizada para novas análises. Aqui, uma possível alteração na conformação poderia explicar a ausência do efeito dominante-negativo nos transfectantes da cauda da myo13.

Para auxiliar a descobrir as funções destas duas miosinas de *T. cruzi*, objetivávamos obter e identificar complexos proteicos que interagem com as miosinas, que provavelmente responderiam quais são as cargas carregadas por estas miosinas. Para isso, pretendíamos realizar uma imunoprecipitação com os anticorpos usando um extrato nativo, no qual se baixaria as miosinas com as proteínas associadas. Como a myo1 parece ser bastante rara, uma alternativa seria avaliar as miosinas recombinantes fusionadas à GFP. Usando o anticorpo específico poderíamos estar precipitando algo não relacionado às proteínas, já que as bandas extras reconhecidas pelos anticorpos ainda não puderam ser analisadas. Usando anti-GFP, então, estaríamos precipitando apenas as miosinas. Então, a estratégia

seria realizar imunoprecipitação do extrato proteico obtido a partir das células transfectadas expressando a proteína fusionada à etiqueta de GFP com anticorpo anti-GFP. Mas, ao contrário do esperado, o anticorpo anti-GFP reconheceu várias proteínas quando foi realizado *western blot* do extrato proteico de *T. cruzi* selvagem, isto é, não expressando GFP. Com isso, concluímos que este procedimento também estaria precipitando diversas outras proteínas, além da miosina conjugada à GFP e ligada aos seus complexos, o que inviabiliza a espectrometria de massas para reconhecer quais seriam esses complexos proteicos ligados às miosinas.

Em 2010, Katta e cols. mostraram que a deleção por nocaute de um alelo da *myo13* de promastigotas de *L. donovani*, causando diminuição dos níveis desta proteína, resultou na falha da montagem do flagelo e do tráfego intracelular. Foi observado, também, um aumento do tamanho da bolsa flagelar nestes parasitas, sugerindo um defeito no transporte vesicular. A diminuição da atividade endocítica foi observada utilizando o fluoróforo FM4-64, enquanto que a diminuição da atividade exocítica foi observada estimando-se a atividade da fosfatase ácida secretada. Esses resultados mostraram que a *myo13* de *L. donovani* é essencialmente requerida para o tráfego intracelular nas fases promastigotas, principalmente para a montagem do flagelo.

A *myo13* ainda não foi descrita em nenhum outro organismo, mas no trabalho onde Spitznagel e cols. (2010) caracterizaram a *myo1* de *T. brucei*, eles comentam que experimentos preliminares de RNAi da *myo13* de *T. brucei* não revelaram efeitos óbvios no tráfego de vesículas e nem no crescimento das formas sanguíneas. Pelo fato de que a *myo13* de *T. cruzi* é a única miosina altamente expressa, como mostrado nos resultados que analisaram quantitativamente tanto o proteoma (MARCHINI *et al.*, em preparação) quanto o transcriptoma (PROBST *et al.*, em preparação) total do parasita, acreditamos que esta seja a principal miosina em *T. cruzi*. Outro estudo que seria de grande importância para auxiliar a descobrir a função desta miosina em *T. cruzi* seria a deleção gênica por nocaute, já que não é possível realizar interferência por RNA em *T. cruzi*. Infelizmente, não foi possível amplificar com sucesso a região intergênica a 5' do gene da *myo13*, o que impossibilitou que fosse realizado o nocaute desse gene mas, assim que possível, novos oligonucleotídeos iniciadores serão encomendados para a realização deste experimento. No entanto, a semelhança da localização da *myo13* de *T. cruzi* com a *myo13* de *L. donovani*, sugere que ela possa ter papel fundamental na formação do

flagelo também em *T. cruzi*.

Com este trabalho tivemos o intuito de iniciar a caracterização funcional das miosinas de classe I e XIII de *T. cruzi*. De nossos objetivos iniciais, conseguimos identificar a localização celular tanto por imunofluorescência como pela análise de parasitas transfectantes expressando a região da cauda de miosina fusionada à GFP. A localização da miosina inteira fusionada à GFP não se manteve a mesma, provavelmente por uma falha no correto dobramento da proteína, causada pela GFP localizado na região N-terminal da proteína. A fim de contornar este problema, as miosinas serão clonadas em outro vetor, para expressão das proteínas fusionadas à GFP na região C-terminal. Utilizando os anticorpos produzidos, pretendíamos, também, realizar imunoprecipitação para identificação de complexos proteicos relacionados às miosinas. Este ensaio não foi realizado para a myo1 devido à pouca expressão desta proteína pelo *T. cruzi*, como verificado em ensaios de *western blot*, e será realizado em breve para a myo13.

Outra importante ferramenta para auxiliar a descobrir a função de determinada proteína é a remoção ou inibição da proteína funcional *in vivo*, para que ela não exerça mais a sua função. Para tentar atingir esta situação, dois objetivos foram propostos: a deleção gênica por nocaute e a superexpressão de um dominante negativo. Os ensaios de nocaute ainda estão em andamento; a superexpressão da cauda, que atuaria como um competidor não funcional, entretanto, parece não ter causado efeito perceptível, pois não foi notada nenhuma alteração morfológica e nem no crescimento dos parasitas.

Outro objetivo inicial era a realização de RNAi das miosinas de *T. brucei*. Este objetivo passou a não ser mais necessário porque foi publicado, durante a confecção deste trabalho, um artigo no qual foi realizado o RNAi das miosinas de *T. brucei*.

Apesar das dificuldades surgidas durante o desenvolvimento deste trabalho, podemos sugerir que estas miosinas também tenham participação na endocitose via bolsa flagelar, tráfego de vesículas e formação do flagelo, com base nas localizações observadas das duas miosinas e nos trabalhos publicados descrevendo a myo1 de *T. brucei* e myo13 de *Leishmania spp.*. No entanto, estas dificuldades estão sendo contornadas através de alterações do desenho experimental inicial e o trabalho prosseguirá. Assim, acreditamos que, em breve, possamos agregar mais informações referentes a estas duas miosinas.

6 CONCLUSÕES

1. O *T. cruzi* possui sequências nucleotídicas para genes de nove diferentes miosinas que, apesar de terem características distintas – o que impossibilita de serem classificadas dentro de uma mesma classe – possuem um domínio motor característico das miosinas, com regiões bem conservadas dentro deste domínio.
2. Mesmo sendo um organismo primitivo, o *T. cruzi* possui a miosina de classe I com seu domínio motor conservado quando comparado com organismos evolutivamente distantes.
3. A cauda da myo1 possui uma característica bastante interessante, visto que o domínio TH1, um domínio característico de miosinas de classe I, que acredita-se estar relacionado com interações com membranas celulares, está truncado pela inserção do domínio FYVE, que também tem o potencial de se ligar a membranas celulares.
4. Anticorpos produzidos contra a myo1 reagem fracamente em *western blot* contra o extrato proteico de *T. cruzi* devido à baixa expressão desta proteína, como já era sugerido em ensaios de proteômica e transcriptômica.
5. Ensaios de proteômica e transcriptômica haviam sugerido uma alta expressão da myo13, fato que foi mostrado também em ensaios de *western blot* contra o extrato proteico de *T. cruzi*.
6. Os ensaios de localização celular da myo1, realizados tanto através de imunofluorescência como analisando os transfectantes expressando somente a região da cauda, mostraram que a proteína parece estar concentrada na região da bolsa flagelar, a mesma localização observada em *T. brucei* e assim, pode também estar envolvida com a endocitose via bolsa flagelar.
7. Os ensaios de localização celular da myo13, realizados através de imunofluorescência, mostraram que a proteína parece estar concentrada na região da base do flagelo, a mesma localização observada em *L. donovani* e assim, pode estar envolvida com a montagem do flagelo.
8. A superexpressão das caudas das miosinas visando um ensaio dominante negativo não causou nenhum efeito morfológico na célula e nem na taxa de replicação dos parasitas.

7 PERSPECTIVAS

1. Analisar as bandas de tamanho não esperado visualizadas no *western blot* com os soros específicos da myo1, através de imunoprecipitação e espectrometria de massas.
2. Analisar o *pool* de proteínas que precipitaram juntamente com a myo1 fusionada à etiqueta PTP.
3. Realizar imunocitoquímica com os antissoros contra a myo1 e myo13.
4. Realizar imunofluorescência de parasitas em outros estágios do ciclo de vida, com os antissoros contra a myo1 e myo13.
5. Repetir a clonagem e transfecção da cauda da myo13 no vetor pTcGFPN.
6. Clonar as CDSs inteiras e cabeças das myo1 e myo13 no vetor pTcGFPC para expressão da proteína fusionada à etiqueta de GFP na extremidade C-terminal.
7. Tratar células com latrunculina B – agente despolimerizador de filamentos de actina – e verificar se há alterações na localização das miosinas.
8. Realizar imunoprecipitação utilizando o antissoro produzido contra a myo13 a fim de se obter e identificar proteínas que interagem com a miosina através de análise em espectrômetro de massas.
9. Realizar imunoprecipitação utilizando o antissoro produzido contra a myo1 utilizando o extrato do transfectante que superexpressa a proteína, a fim de se obter e identificar proteínas que interagem com a miosina através de análise em espectrômetro de massas.
10. Clonar a cauda da myo1 no vetor pTcPTP para obtenção de complexos através da imunoprecipitação realizada com o anticorpo anti-proteína C, a fim de se obter e identificar proteínas que interagem com a cauda da miosina através de análise em espectrômetro de massas.
11. Realizar nocaute gênico das myo1 e myo13 e verificar alterações celulares.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed 2004.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE S. G.; OLIVEIRA, G. B.; ALONSO, D. R. Histopathology of the conducting tissue of the heart in Chagas' myocarditis. **American Heart Journal**, v. 95, p. 316-324, 1978.

BATISTA, M., *et al.* A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BioMed Central Microbiology**, v. 10, n. 259, 2010.

BEN AMAR, M. F.; PAYS, A.; TEBABI, P.; *et al.* Structure and transcription of the actin gene of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, p. 2166-2176, 1988.

BENCHIMOL-BARBOSA, P. R. Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: Steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation. **International Journal of Cardiology**, v. 145, n. 3, p. 494-6, 2009.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p. 347-82, 1973.

BRUN, R.; SCHONONBERGER, M. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Short communication - acta trop.** v. 36, p. 289-292, 1979.

CAMPBELL, D. A.; *et al.* Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and infection**. v. 5, P. 1231-41, 2003

CANÇADO, J. R. *In*: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. e BARRAL-NETTO, M. (eds) **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. **Biology Letters**, v. 6, p. 342-5, 2010.

CEVALLOS, A. M.; *et al.* *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. **Experimental Parasitology**, v. 103, p. 27-34, 2003.

CEVALLOS, A. M.; *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Multiple actin isovariants are observed along different developmental stages. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 249-59, 2011.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CORREA, J. R. *et al.* Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytostome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 58-66, 2008.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.; BOIA, M. N.; FERNANDES, O.; BONFANTE, C.; CAMPOS, J. E.; SANTOS, L.; DEVERA, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 159-65, 2002.

CROSS, G. A. M.; MANNING, J. C. Cultivation of *Trypanosoma brucei* ssp. in semidefined and defined media. **Parasitology**, v. 67, p. 315-331, 1973.

DE ARRUDA, M.; MATSUDAIRA, V.; MATSUDAIRA, P. Cloning and sequencing of the *Leishmania major* actin-encoding gene. **Gene**, v. 139, p. 123-125, 1994.

DE MELO, L. D. B.; SANT'ANNA, C.; REIS, S. A.; LOURENÇO, D.; DE SOUZA, W.; LOPES, U. G.; CUNHA-E-SILVA, N. L. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. **Parasitology**, v.135, p. 955-965, 2008.

DE SOUZA, W.; MEZA, I.; MARTINEZ-PALOMO, A.; SABANERO, M.; SOUTO-PADRON, T.; MEIRELLES, M. N. L. *Trypanosoma cruzi*: distribution of fluorescently labeled tubulin and actin in epimastigotes. **Journal of Parasitology**, v. 69, p. 138-42, 1983.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 (Suppl. I), p. 89-100, 2009.

DIAS J. C. P. In: BRENNER, Z.; ANDRADE, A. Z. e BARRAL-NETTO, M. (eds) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. ed. Guanabara Koogan S.A., 2000.

DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251-61, 2005.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, 2005.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *T. cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. (eds), ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, 2a Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 41-7, 2000.

GARCÍA-SALCEDO, J. A.; PÉREZ-MORGA, D.; GIJÓN, P.; DILBECK, V.; PAYS, E.; NOLAN, D. P. A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **The EMBO Journal**, v. 23, p. 780-789, 2004.

HANNAERT, V., *et al.* Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, n. 11, 2003.

HIDE, G. History of Sleeping Sickness in East Africa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 112-125, 1999.

INVITROGEN. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com>>. Acesso em 10/02/2009.

KATTA, S. S.; SAHASRABUDDHE, A. A.; GUPTA, C. M. Flagellar localization of a novel isoform of myosin, myosin XXI, in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, p. 105-10, 2009.

KATTA, S. S. *et al.* Trafficking activity of myosin XXI is required in assembly of *Leishmania* flagellum. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 12, p. 2035-44, 2010.

KELLY, S.; WICKSTEAD, B.; GULL, K. An *in silico* analysis of trypanosomatid RNA polymerases: insights into their unusual transcription. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 1435-1437, 2005.

KIM, S.; COULOMBE, P.A. Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 75-81, 2010.

KOHL, L.; GULL, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, p. 1-9, 1998.

LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITES OS PUBLIC HEALTH CONCERNS. Disponível em <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em 15/04/2008.

LUKES, J.; *et al.* Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. **Current Genetics**. v. 48, p. 277–299, 2005.

McCONNELL, R. E.; TYSKA, M. J. Leveraging the membrane – cytoskeleton interface with myosin-1. **Trends in Cell Biology**, v. 20, p. 418-26, 2010.

MICHELS, P.A.; HANNAERT, V.; BRINGAUD, F. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. **Parasitology Today** (Regular Edition), v.16, p. 482-489, 2000.

MOOSEKER, N. S.; CHENEY, R. E. Unconventional myosins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 633-675, 1995.

MORGAN, G. V.; *et al.* The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 11, p. 491-6, 2002a.

MORGAN, G. V.; *et al.* The kinetoplastida endocytic apparatus. Part II: a machinery and components of the system. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 12, p. 540-6, 2002b.

MORTARA, R. A. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. **The Journal of Protozoology**, v. 36, p. 8-13, 1989.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; *et al.* Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653-55, 2009.

NOLAN, D. P.; GARCIA-SALCEDO, J. A. Loss of actin does not affect export of newly synthesized proteins to the surface of *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 157, p. 233-235, 2008.

ODRONITZ, F.; KOLLMAR, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2269 manually annotated myosins from 328 species. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 196, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR). Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas>>. Acesso em: 19/09/2010.

PEACOCK, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, p. 389-47, 2007.

PODLIPAEV, S. The more insect trypanosomatids under study-the more diverse Trypanosomatidae appears. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 648-52, 2001.

RODRIGUEZ, O. C. *et al.* Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 7, p. 599-609, 2003.

SAHASRABUDDHE, A. A.; BAJPAI, V. K; GUPTA, C. M. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterization, subcellular localization and association with subpellicular microtubules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, p. 105-14, 2004.

SCHMUÑIS, G A. A tripanossomíase americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A; BARRAL NETTO, M. (eds), **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 1-15, 2000.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P.T. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 117-143, 1995.

SHERLOCK, I. A. Vetores. In BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETTO, M. (eds), **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**, 2a Ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 21-47, 2000.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-74, 2006.

SIMPSON, L. *et al.* Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 6182-96, 1987.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D. *et al.* Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 97, p. 6986-6993, 2000.

SIMPSON, L.; *et al.* Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. **RNA**, v. 10, p. 159–170, 2004.

SPITZNAGEL, D.; O'ROURKE, J. F.; LEDDY N.; HANRAHAN, O.; NOLAN, D. P. Identification and Characterization of an Unusual Class I Myosin Involved in Vesicle Traffic in *Trypanosoma brucei*. **Plos One**, v. 5, n. 8, pii:e12282, 2010.

STURM, N. R.; SIMPSON, L. *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 22, p. 6277-81.

TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 279 – 288, 2006.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 472-81, 2001.

WICKSTEAD, B.; ERSFELD, K.; GULL, K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, p.211-216, 2002.

WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS, G.A.M. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, p. 89–101, 1998.

WOOLNER, S.; BEMENT, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 6, p. 245-252, 2009.

ANEXO



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Caracterização de proteínas de *Trypanosoma cruzi*. "

número P-434/07, proposto por Marco Aurélio Krieger, foi licenciado pelo
Nº L-005/09.

Sua licença de Nº L-005/09 autoriza o uso anual de :

- 200 *Mus musculus*

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 21 de janeiro de 2013.

Rio de Janeiro, 21/01/2009


Dra. Norma Vollmer Labarthe

Coordenadora da CEUA

FIOCRUZ